

**BEEINFLUSSUNG DES INTRAZELLULÄREN  
ENERGIESTOFFWECHSELS DURCH ANTIKÖRPER  
GEGEN DEN ADENINNUKLEOTIDTRANSLOKATOR -**

Untersuchungen am lebenden Meerschweinchenherzen  
mit Hilfe der Methode der nicht-wässrigen Fraktionierung

**KARSTEN SCHULZE**

**1986**

*Diss  
München*







Aus der Medizinischen Klinik I am Klinikum Großhadern  
der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. G. Riecker

BEEINFLUSSUNG DES INTRAZELLULÄREN ENERGISTOFFWECHSELS  
DURCH ANTIKÖRPER GEGEN DEN ADENINNUKLEOTIDTRANSLOKATOR -  
UNTERSUCHUNGEN AM LEBENDEN MEERSCHWEINCHENHERZEN  
MIT HILFE DER METHODE DER NICHT-WÄSSRIGEN FRAKTIONIERUNG

Inaugural Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
in der gesamten Medizin  
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Karsten Schulze  
aus München

1986

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. H.-P. Schultheiß

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Riecker

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 3. 6. 1986

## Inhalt

|                                                                          |       |
|--------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. Einleitung                                                            | S. 1  |
| 2. Theoretische Grundlagen                                               |       |
| 2.1. Regulation des Adeninnukleotidtransportes                           | S. 9  |
| 2.2. Verhalten des Adeninnukleotidtranslokators unter Belastung          | S. 11 |
| 2.3. Notwendigkeit der isolierten Organperfusion                         | S. 13 |
| 2.4. Das intra- und das extramitochondriale Kompartiment                 | S. 13 |
| 3. Material und Methoden                                                 |       |
| 3.1. Material                                                            |       |
| 3.1.1. Chemikalien                                                       | S. 15 |
| 3.1.2. Geräte                                                            | S. 16 |
| 3.2. Methoden                                                            |       |
| 3.2.1. Herstellung von Antikörpern gegen den Adeninnukleotidtranslokator | S. 17 |
| 3.2.2. Nachweis der Antikörper                                           | S. 18 |
| 3.2.3. Funktionstest der Antikörper                                      |       |
| 3.2.3.1. Isolierung der Mitochondrien                                    | S. 19 |
| 3.2.3.2. Messung des Nukleotidtransportes                                | S. 20 |
| 3.2.4. Das isoliert perfundierte Herz                                    | S. 22 |
| 3.2.5. Die Nicht-wäßrige Fraktionierung                                  |       |
| 3.2.5.1. Frierstopp und Lyophilisation                                   | S. 25 |
| 3.2.5.2. Homogenisieren und Filtration                                   | S. 26 |
| 3.2.5.3. Gleichgewichts-Zentrifugation und Fraktionierung                | S. 27 |
| 3.2.6. Durchführung der enzymatischen Messungen                          | S. 30 |
| 3.2.7. Berechnung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen           | S. 36 |
| 3.2.8. Pufferlösungen                                                    | S. 43 |
| 4. Ergebnisse                                                            |       |
| 4.1. Antikörpertiter und Hemmung des Nukleotidaustausches in vitro       | S. 45 |
| 4.2. Hämodynamik und anaerobe Glykolyse                                  | S. 46 |
| 4.3. Intrazelluläre Metabolitkonzentrationen                             | S. 48 |
| 5. Diskussion                                                            |       |
| 5.1. Problematik der Nicht-wäßrigen Fraktionierung                       | S. 56 |
| 5.2. Wirkungsweise des Adeninnukleotidtranslokators                      | S. 63 |
| 5.3. Beurteilung der Ergebnisse                                          | S. 64 |
| 5.4. Das pathophysiologische Modell                                      | S. 69 |
| 5.5. Hinweise für eine klinische Bedeutung der Antikörper                | S. 71 |
| 6. Zusammenfassung                                                       | S. 73 |
| 7. Literaturverzeichnis                                                  | S. 76 |



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## 1. Einleitung

Im Energiestoffwechsel der aeroben Eukaryontenzelle nimmt der Adeninnukleotidtranslokator (ANT) eine Schlüsselstellung ein. Es handelt sich bei ihm um ein die innere mitochondriale Membran durchdringendes Protein mit einem Molekulargewicht von 60000 Dalton, das aus zwei identischen Untereinheiten besteht (35). Der ANT ist verantwortlich für den Transport der energiereichen Phosphate Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) durch die innere mitochondriale Membran. Diese ist ansonsten für Moleküle solcher Größe impermeabel. Der Transport ist für diese beiden Substanzen hochspezifisch (53). Er ist unter physiologischen Bedingungen gerichtet und findet als Gegen Austausch im Verhältnis 1:1 statt (27,31). Das heißt, intramitochondrial synthetisiertes ATP wird in Richtung Cytosol ausgeschleust, wobei für jedes den Matrixraum verlassende Molekül ATP ein Molekül ADP in das mitochondriale Kompartiment aufgenommen wird. Membranpotential, Wasserstoffionenkonzentration, Temperatur und das Verhältnis der Konzentrationen der Adeninnukleotide regulieren die Transportaktivität des Carriers (32,38,36).

Erkenntnisse über funktionelle und proteinchemische Eigenschaften des ANT basieren hauptsächlich auf der Entdeckung zweier Liganden - Carboxyatractylat (CAT) und Bongkrekat (BKA) -, welche spezifisch am Carrier binden (30). CAT, das nicht durch die innere mitochondriale Membran diffundieren kann, bindet nur auf der cytosolischen, BKA hingegen nur auf der dem Matrixraum zugewandten Seite des ANT. Hierdurch konnte gezeigt werden, daß der ANT in zwei verschiedenen

Konformationszuständen vorliegt (61). In der "c"-Konformation ist die Ligandenbindungsstelle zum Cytosol hin frei, so daß CAT binden kann. In der "m"-Konformation hingegen ist diese zum Matrixraum gerichtet, und EKA wird gebunden. Während des Transportvorganges von Adeninnukleotiden findet ein Wechsel von der c- in die m-, bzw. von der m- in die c-Konformation statt. In Gegenwart der spezifischen Liganden, welche den ANT in der c- (CAT) bzw. in der m-Konformation (EKA) fixieren, ist der ADP/ATP-Austausch gehemmt. Der ANT erfüllt seine Transportfunktion also nicht durch Rotation, sondern durch einen Konformationsübergang. Diese Art des Transportes über eine Membran wird als "gated-pore" Mechanismus bezeichnet (29).

Durch die Fixierung des ANT in einem bestimmten Konformationszustand bewirken CAT und EKA auch einen Schutz des Carrierproteins vor Denaturierung. Hierdurch ist es möglich, den ANT als CAT- bzw. EKA-Proteinkomplex mit Hilfe nicht-ionischer Detergentien aus der Membran herauszulösen, ohne daß es zu einer Zerstörung der Proteinstruktur kommt (34,33,54). Da es durch eine partielle Denaturierung des Proteins zu einer Freisetzung von  $^3\text{H}$ -CAT bzw.  $^3\text{H}$ -EKA kommt, stellt die Bestimmung der spezifischen Bindung der Liganden am ANT gleichzeitig einen empfindlichen Test für die Intaktheit des Proteins dar. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß der isolierte Carrier nach dem Einbau in Liposomen, also im "rekonstituierten System", sowohl bezüglich seiner Funktion als auch bezüglich der Regulation dem in der intakten mitochondrialen Membran befindlichen Protein entspricht. Er stellt also das vollständige Transportsystem dar (38,39).

Immunchemische Untersuchungen des ANT zeigten sowohl eine

Konformationsspezifität als auch eine Organspezifität (61). Bindungs- und Absorptionsstudien an Mitochondrien und am isolierten Protein ergaben neben einer partiellen Kreuzreaktivität organspezifische antigene Determinanten am ANT von Niere, Herz und Leber (60,61). Da die Antikörper zu einer organspezifischen Hemmung des Nukleotidtransportes führten, konnte gezeigt werden, daß der Translokationsapparat des Carriers zumindest teilweise die Organspezifität hervorruft (59,61,66). Ebenfalls konnte belegt werden, daß auch die immunchemische Verschiedenheit der beiden Konformationszustände durch den Translokationsapparat mitbedingt ist (59).

Die Bedeutung des ANT reicht jedoch über das experimentelle Studium zum Zwecke einer immunologischen Charakterisierung hinaus. So konnte gezeigt werden, daß der ANT bei der primär biliären Zirrhose, der Myokarditis und der dilativen Kardiomyopathie ein Auto-Antigen darstellt (63,64,68,70). Die bei diesen Erkrankungen auftretenden Auto-Antikörper wurden bezüglich ihrer Spezifität gegenüber dem ANT, ihrer Hemmwirkung auf den Nukleotidaustausch und ihres Effektes auf die Ligandenbindung untersucht. Sie erwiesen sich gleichfalls als organ- und konformationsspezifisch und sind in der Lage, den Adennukleotidaustausch zumindest in vitro zu hemmen. Als Ausdruck der Nukleotidtransporthemmung durch Fixierung des Konformationszustandes war die HKA-Bindung nach Antikörperbindung deutlich erniedrigt (65). Gleichzeitig bewirkte ein Teil der Antikörper auch eine Herabsetzung der CAT-Bindung, in anderen Fällen blieb diese trotz Hemmung des Transportes unbeeinflusst (69). Dies spricht für die Existenz verschiedener Auto-Antikörperpopulationen, die eine Hemmung

des Nukleotidtransportes einerseits durch die Besetzung der Substratbindungsstelle selbst bewirken, was zur Erniedrigung der CAT-Bindung führt, oder aber andererseits die Konformation des Proteins fixieren, ohne an der Substratbindungsstelle selbst anzugreifen.

Darüber hinaus existieren Antikörper, die ein Nukleotid-Leakage an Mitochondrien verursachen. Dieser Nukleotidausstrom konnte nicht auf eine Membranschädigung zurückgeführt werden, sondern erwies sich als ANT-spezifisch (67).

Es finden sich also bei diesen vermutlich autoimmunologischen Erkrankungen eine Vielzahl hochspezifischer Auto-Antikörperpopulationen, die gegen den ANT gerichtet sind, und die sich in vitro als funktionell aktiv, also den Nukleotidaustausch hemmend, erweisen.

Hier stellt sich nun die Frage, ob diese Auto-Antikörper auch in vivo wirksam sind, das heißt, ob sie auch am lebenden Organ zu einer Hemmung des Nukleotidaustausches und damit zu einem Energiedefizit im Cytosol führen. Von der Beantwortung dieser Frage hängt es ab, ob diesen Auto-Antikörpern möglicherweise eine pathogenetische Bedeutung zugesprochen werden kann, oder ob es sich bei ihrem Auftreten im Zusammenhang mit den oben erwähnten Erkrankungen lediglich um ein Epiphänomen handelt.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch Bestimmung des intrazellulären Energiestoffwechsels des Herzens unter der Einwirkung oben erwähnter Auto-Antikörper, eine Antwort auf diese Frage zu finden. Da die hierfür benötigten Meßdaten bei Patienten nicht zu bestimmen sind, wurden die Untersuchungen an den Herzen von gegen den ANT immunisierten Meerschweinchen durchgeführt.

Um eine Hemmung des ANT in vivo nachweisen zu können, müssen Parameter erfaßt werden, die durch die Carrieraktivität reguliert werden. Der ANT erlangt seine zentrale Bedeutung im Energiestoffwechsel der Zelle über die Bereitstellung des "Energieträgers" ATP, welches intramitochondrial durch die oxidative Phosphorylierung entsteht. Lediglich ein kleiner Anteil des im Cytosol benötigten ATP wird durch die anaerobe Glykolyse geliefert. Da dieser Anteil in der Herzmuskelzelle jedoch maximal 5-7% der Gesamt-ATP Produktion erreicht, ist er von untergeordneter Bedeutung (37). Bei gerichtetem Nukleotidtransport des aktiven Carriers erfolgt im Cytosol ein ATP-Zustrom und ein ADP-Abstrom. Im Mitochondrium äußert sich die Wirkung des ANT in entgegengesetzter Weise. Veränderungen der Carrieraktivität müssen also in erster Linie die ATP/ADP-Verhältnisse betreffen, und zwar gegensinnig in den beiden Kompartimenten Cytosol und Mitochondrium. Eine Gleichung, die diese Verhältnisse beschreibt, ist das Phosphorylierungspotential des ATP:

$$\Delta G_{\text{ATP}} = \Delta G_{\text{O}} + RT \times \ln( [\text{ATP}] / [\text{ADP}] \times [\text{Phosphat}] )$$

Diese Formel drückt aus, um welchen Energiebetrag die Hydrolysereaktion des ATP von ihrem thermodynamischen Gleichgewicht entfernt ist, wieviel Stoffwechselenergie also in Form von ATP verfügbar ist. Die Nettotransportrate des ANT für ATP wird durch das Phosphorylierungspotential des Cytosols und des Mitochondriums kontrolliert. Dabei interessiert primär die cytosolisch/mitochondriale Potentialdifferenz, denn sie gibt den Energiegradienten des ATP über der inneren mitochondrialen Membran an:

$$\frac{\text{ATP}(\text{cyt}) \times \text{ADP}(\text{mit}) \times \text{Phosphat}(\text{mit})}{\text{ATP}(\text{mit}) \times \text{ADP}(\text{cyt}) \times \text{Phosphat}(\text{cyt})}$$

Der Wert dieses Quotienten spricht sehr sensibel auf Änderungen der Carrieraktivität an. Hieraus ergibt sich, daß beispielsweise eine Reduzierung der Transportrate - über eine Abnahme von ATP(cyt) und ADP(mit) bei gleichzeitiger Zunahme von ADP(cyt) und ATP(mit) - den Wert dieses Quotienten stark senken müßte. Daß dies tatsächlich so zu erwarten ist wird im Abschnitt "theoretische Grundlagen" genauer erläutert.

Die Bestimmung der cytosolisch/mitochondrialen Potentialdifferenz als Maß für die Aktivität des ANT macht die intrazelluläre Messung von Metabolitkonzentrationen erforderlich. Diese muß die Höhe der Spiegel der Adenosinphosphate und des anorganischen Phosphates getrennt für das cytosolische und das mitochondriale Kompartiment erfassen. Sie muß zugleich Gewähr bieten, die wahren in vivo Konzentrationen zu liefern. Voraussetzung ist also, daß es während der Gewebeaufarbeitung, die für diese Bestimmungen unumgänglich ist, zu keinen Konzentrationsverschiebungen der einzelnen Parameter kommt.

Es existieren zwei Methoden, die diese beiden Bedingungen erfüllen können. Zum einen ist dies die "Digitoninmethode" (85), zum anderen die Nicht-wäßrige Fraktionierung (13). Bei der Digitonintechnik wird die Plasmamembran der Zelle durch Herauslösen des Cholesterins durchlässig. Die Mitochondrien können dann durch Zentrifugation isoliert werden. Bei der Nicht-wäßrigen Fraktionierung erfolgt die Abtrennung der Mitochondrien durch einen Dichtegradienten in wasserfreien Medien. Beide Verfahren erlauben einen sehr schnellen

Stopp des Stoffwechsels durch tiefe Temperaturen, eine wichtige Voraussetzung zur genauen Messung der Metabolitspiegel im lebenden Organismus. Obwohl die Digitoninmethode weit weniger aufwendig ist, hat sie den Nachteil, nur an isolierten Zellen anwendbar zu sein. Da wir jedoch die Metabolitkonzentrationen am intakten Organ unter quasi in vivo Bedingungen bestimmen wollten, wurde die Nicht-wäßrige Fraktionierung als einzig mögliche Methode gewählt.

#### Das Prinzip der Nicht-wäßrigen Fraktionierung:

Die Symbiontenhypothese besagt, daß Mitochondrien und Chloroplasten - beide werden oft als "Plasten" zusammengefaßt - stammesgeschichtlich auf procaryotische Endosymbionten, also Symbionten innerhalb einer Zelle, zurückgehen. Dabei dürften sich die Plastiden von blualgenartigen, die Mitochondrien von bakterienartigen Organismen ableiten. Die doppelte Membranhülle der Plasten, der Besitz einer eigenen genetischen Information und einer eigenen Protein-Synthesemaschinerie - procaryotische Ribosomen vom 70S-Typ - stützen diese Theorie. Folglich geht die innere mitochondriale Membran nicht aus der Zell- bzw. den übrigen Cytoplasmamembranen hervor und unterscheidet sich von diesen. Beispielsweise findet sich in ihr, wie auch in Bakterien, Cardiolipin. Hingegen fehlt den Bakterien und den Mitochondrien das Cholesterol, das bei höheren Organismen bis zu einem Drittel der Membranlipidfraktion ausmachen kann.

Diese Variationen in der Zusammensetzung der Zell- und der Mitochondrienmembran führen zu geringfügigen Dichteunterschieden

zwischen diesen Strukturen. So besitzt die innere mitochondriale Membran in wasserfreiem Zustand ein etwas geringeres spezifisches Gewicht als der überwiegende Rest der zellulären Membranen. Die Methode der Nicht-wäßrigen Fraktionierung macht sich diesen Unterschied zunutze. Fraktionierung bedeutet hier: Auftrennung mitochondrialer und nicht-mitochondrialer Membranen aufgrund ihrer Dichteunterschiede. Diese Trennung erfolgt in einem Dichtegradienten, der aus nicht-wäßrigen, also unpolaren Medien aufgebaut ist, um den Ablauf von Stoffwechselreaktionen im untersuchten Gewebe auszuschalten. In einem Schwerfeld hoher Intensität ordnet sich das Zellmaterial in dem Bereich des Gradienten an, der genau seiner Dichte entspricht. Dieser Vorgang wird Gleichgewichtszentrifugation genannt. Durch schichtweises Absaugen läßt sich der Gradient anschließend in mehrere Fraktionen teilen, die sich durch einen unterschiedlichen Anteil bestimmter Membrantypen auszeichnen.

Die Unterscheidung der einzelnen Zellanteile, hier also der mitochondrialen von den nicht-mitochondrialen, erfolgt über Aktivitätsbestimmungen sogenannter Leitenzyme. Dies sind Enzyme, die, wie in Abschnitt 3.2.7. beschrieben, nur in einem bestimmten Organell vorkommen, deren Aktivität also in direkter Beziehung zur Menge dieses Organells steht.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1. Regulation des Adeninnukleotidtransportes

Austauschexperimente mit markierten Nukleotiden an Mitochondrien wurden sowohl bei intakter Atmung als auch bei vom Elektronenfluß durch die Atmungskette entkoppelter oxidativer Phosphorylierung durchgeführt (28). Bei den deenergetisierten Mitochondrien traten alle Möglichkeiten des Nukleotidaustausches in gleichem Umfang auf, also neben dem ATP-ADP Austausch auch der entgegengesetzte ADP-ATP Austausch, sowie der Transport gleicher Nukleotide, also ATP-ATP und ADP-ADP. In energetisierten Mitochondrien überstieg die Rate der physiologisch einzig sinnvollen Kombination - Ausstrom von ATP bei gleichzeitigem ADP Einstrom - alle übrigen Kombinationen zusammen um ein Mehrfaches (30,28).

Im rekonstituierten System, in dem der ANT in Phospholipidvesikel eingebaut wurde, ist es möglich, das Membranpotential über der mitochondrialen Membran durch einen  $K^+$ -Gradienten zu simulieren und zu modulieren (38). Auch hier findet bei einer Potentialdifferenz 0, entsprechend dem nicht-energetisierten Zustand der Mitochondrien, kein gerichteter Nukleotidtransport statt. Bei einer Potentialdifferenz von 180 mV (außen positiv) übersteigt der ADP Einstrom bei gleichzeitigem ATP Ausstrom die entgegengesetzte Kombination um mehr als das 30-fache (30). Das Maß, in dem jede der vier möglichen Austauscharten zur Gesamttransportrate des ANT beiträgt, ist direkt abhängig vom Membranpotential der Mitochondrien.

ATP liegt in der Zelle als  $\text{ATP}^{4-}$ -Ion, ADP als  $\text{ADP}^{3-}$ -Ion vor. Das aktive Zentrum des ANT, an das die Nukleotide während des Transportes binden, ist 3-fach positiv geladen. Der Komplex ( $\text{C}^{3+} \times \text{ATP}^{4-}$ ) trägt also eine negative Ladung, während ( $\text{C}^{3+} \times \text{ADP}^{3-}$ ) sich elektrisch neutral verhält. Ein in das Cytosol gerichteter ATP Transport ist erklärbar durch die "Sogwirkung" des cytosolisch stärker positiven Membranpotentials. Die Größenordnung dieses elektrischen Gradienten liegt bei etwa 120 - 150 mV (81,48,46,49). Zusätzlich konnte an der Außenseite der inneren mitochondrialen Membran eine um ca. 0,3 - 1,3 pH-Einheiten höhere Protonenkonzentration gemessen werden. Diese bedingt eine weitere cytosolische Erhöhung der positiven Ladung, wirkt also synergistisch mit dem Membranpotential. Für die Summe aus Membranpotential und Protonengradienten führte Mitchell den Begriff "Protonmotive Force" (45) ein. Dieser besagt, daß die beim Elektronentransport gewonnene Energie in Form des Membranpotentials und eines Protonengradienten über der Membran gespeichert wird. Beide Energiespeicher zusammen liefern die Energie, die zur ATP-Synthese und zum ATP-Transport nötig ist.

Die zentrale Bedeutung des Phosphorylierungspotentials für die Bereitstellung von verfügbarer Energie für den Zellstoffwechsel wurde einleitend betont. Durch den ANT wird das cytosolische Phosphorylierungspotential aufgebaut. Es findet also ein Energietransfer von der "Protonmotive Force" zum Phosphorylierungspotential statt.

Es konnte gezeigt werden, daß das cytosolische Phosphorylierungspotential mit etwa 24,1 kJ/mol ATP am unbelasteten Herzen deutlich höher ist als das mitochondriale mit etwa 16,4 kJ/mol

ATP (77). Ebenso konnte eine deutliche Zunahme der Potentialdifferenz bei künstlichem Herzstillstand beobachtet werden (25). Diese Werte belegen, daß der ANT nicht als bloßer Katalysator wirkt, der zu einem Ausgleich der ATP- und ADP-Konzentrationen in Cytosol und Matrixraum führt, sondern tatsächlich in der Lage ist, Energie des elektrochemischen Gradienten zum Aufbau eines Gradienten aus energiereichen Phosphaten zu nutzen. In Ruhe nimmt diese positive cytosolisch-mitochondriale Potentialdifferenz des ATP den höchsten Wert an; der größtmögliche Teil der Energie aus der "Protonmotive Force" ist ausgeschöpft. Die gerichtete Carrieraktivität stimulierende Wirkung von Membranpotential und Protonengradient wird durch das relativ zum Matrixraum hohe cytosolische Phosphorylierungspotential des ATP ausgeglichen. Der ANT arbeitet nahezu im Gleichgewicht, der Anteil an gerichtetem Nukleotidtransport ist relativ niedrig.

## 2.2. Verhalten des ANT unter Belastung

Beim arbeitenden Herzen kommt es durch ATP Verbrauch zu einer ADP Bildung, wodurch sich das cytosolische Phosphorylierungspotential des ATP erniedrigt (77). Dieser Prozeß kann im Herzen mittels anaerober ATP Erzeugung in der Glykolyse nicht aufgefangen werden, da deren Kapazität hierzu nicht ausreicht (37). Es entsteht also ein Ungleichgewicht zwischen niedrigem cytosolischem Phosphorylierungspotential und noch hoher "Protonmotive Force". Dies führt zu einer Aktivierung des ANT und somit zu einem verstärkten gerichteten Nukleotidfluß von ATP ins Cytosol. Dadurch kommt es zu einer Erniedrigung der

"Protonmotive Force" und letztlich zur Aktivierung der Atmungskette. Erst das am langsamsten reagierende Glied im System der oxidativen Phosphorylierung, der sogenannte "rate limiting step" fängt diese "Rückstoßwirkung" auf. Neuere Daten sprechen diese Kontrollfunktion zumindest teilweise dem ANT zu (79). Bei einer Erniedrigung des cytosolischen Phosphorylierungspotentials des ATP kommt es also nicht zu einer gleichzeitigen Verminderung des Membranpotentials in entsprechender Höhe, sondern dieser Effekt wird in dem Maße "gedämpft", in dem dem ANT eine Kontrollfunktion im System der oxidativen Phosphorylierung zukommt. Konsequenterweise sollte bei Belastung die Erniedrigung des cytosolischen Phosphorylierungspotentials deutlicher sein als die Erhöhung des mitochondrialen Phosphorylierungspotentials.

Unter physiologischen Anforderungen reicht die Aktivität des ANT immer aus, um einen erhöhten Energiebedarf im Cytosol aufzufangen. Fällt das Transportprotein allerdings durch eine teilweise Blockierung von ANT-Molekülen in zunehmendem Maße aus, wird der verbleibende Restanteil an intaktem Carrier, nach Erreichen seiner maximalen Aktivität, nicht mehr in der Lage sein, den ATP-Bedarf im Cytosol zu decken. Da dann die Atmungskette und die ATP-Synthese effektiver arbeiten als der ANT, wäre ein weiteres Absinken des cytosolischen Phosphorylierungspotentials, bei hohem mitochondrialem Phosphorylierungspotential, die Folge. Bei einer Blockade des ANT durch Antikörper ist also zu erwarten, daß die cytosolisch-mitochondriale Potentialdifferenz des ATP stark abnimmt, möglicherweise sogar negativ wird. Dieser Effekt sollte um so eher zu beobachten sein, je stärker das Herz belastet ist, je mehr ANT-Moleküle also zu gerichtetem Nukleotidtransport angeregt sind.

Experimentell konnte eine Störung der cytosolischen energieabhängigen Stoffwechselprozesse durch Hemmung des ANT an CAT-perfundierter Leber gezeigt werden (1). Hierbei konnte außerdem eine Zunahme des mitochondrialen ATP/ADP-Quotienten beobachtet werden (74), was auch für eine Beeinträchtigung des Auswärtstransportes von intramitochondrial synthetisiertem ATP spricht.

### 2.3. Notwendigkeit der isolierten Organperfusion

Es gibt drei Gründe, die es erforderlich machen, das Meerschweinchenherz zunächst aus dem Körper des Tieres zu entfernen und isoliert in einer "Working Heart"-Apparatur schlagen zu lassen, bevor es mit der Nicht-wäßrigen Fraktionierung aufgearbeitet wird.

Erstens ermöglicht dieses Vorgehen, das Herz unter definierten Bedingungen arbeiten zu lassen, und zugleich Daten über Herzarbeit, Sauerstoffverbrauch und Laktatfreisetzung zu gewinnen.

Zweitens ist das Herz isoliert einem Stoffwechselstopp durch Temperaturerniedrigung viel besser zugänglich als in situ.

Drittens sollen die Metabolitkonzentrationen nur in zwei Zellkompartimenten, dem Cytosol und dem Matrixraum der Mitochondrien bestimmt werden. Dies setzt voraus, daß die zellulären Bestandteile des Blutes, als drittes Kompartiment, durch die Perfusion des Herzens mit hämoglobinfreier Lösung ausgewaschen werden.

### 2.4. Das intra- und das extramitochondriale Kompartiment

Ein Kompartiment ist definitionsgemäß der Lösungsraum einer Substanz,

in dem diese frei diffundieren kann, also keine Konzentrationsgradienten ausbildet. Bei den Konzentrationsbestimmungen der untersuchten Stoffe (ATP, ADP und Phosphat), werden nur der intra- und extramitochondriale Wert ermittelt. Der Begriff extramitochondrial wird also mit cytosolisch gleichgesetzt, was im Grunde falsch ist. Auch der Zellkern, das Endoplasmatische Retikulum, der Raum zwischen den beiden mitochondrialen Membranen, Lysosomen und Peroxisomen bilden eigene Bereiche, die streng genommen nicht dem Cytosol zuzurechnen sind. Die Kernmembran und das Endoplasmatische Retikulum, welches auch die äußere mitochondriale Membran bildet, sind jedoch aufgrund von Poren für eine Vielzahl von Stoffen permeabel, so daß die hier untersuchten Metabolite und Enzyme dort keine Aktivitäts- bzw. Konzentrationsunterschiede aufweisen. Beide Membranstrukturen umschließen also in diesen Fällen keine abgeschlossenen Lösungsräume, kommen hier demnach nicht als eigene Kompartimente in Betracht (72).

Lysosomen und Peroxisomen, deren Stoffwechselvorgänge hier ohne Belang sind, beinhalten nur je ca. 2% des gesamten Zellvolumens und werden deshalb als Kompartiment vernachlässigt.

Austauschexperimente mit Adeninnukleotiden zeigen, daß der mitochondriale Matrixraum nicht weiter in Kompartimente unterteilt ist (23). Im Matrixraum befindliche Substanzen können dort frei diffundieren und bilden innerhalb dieses Raumes keine Konzentrationsgradienten aus.

Zusammenfassend ist es daher berechtigt, nur von extra- und intramitochondrialen Konzentrationen zu sprechen. Als Synonym für den extramitochondrialen Raum wird hier also der Ausdruck cytosolisch verwendet.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Chemikalien

ADP, ATP: Boehringer, Mannheim

$^{14}\text{C}$ -ATP: New England Nuclear, Dreieichenhain

Carboxyatractylat: Boehringer, Mannheim

Cóenzyme (NADH, NADP, APAD): Boehringer, Mannheim

Creatin-Phosphokinase: Sigma, München

Enzyme: alle nicht gesondert aufgeführten Enzyme wurden über  
die Firma Boehringer, Mannheim bezogen

Fetales Kälberserum: Gibco Europe, Karlsruhe

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase: Sigma, München

Glucose-1,6-Diphosphat-Trinatriumsalz: Boehringer, Mannheim

Hydroxylapatit: Bio-Rad, München

$^{125}\text{J}$ -Protein A: New England Nuclear, Dreieichenhain

Insulin: Sigma, München

L-Noradrenalin: Sigma, München

Phosphoenolpyruvat: Boehringer, Mannheim

Rinderserumalbumin: Roth, Karlsruhe

Szintillationsflüssigkeit: Zinsser, Frankfurt

Triton X-100: Sigma, München

Alle übrigen Substanzen wurden über die Firma Merck,  
Darmstadt bezogen.

### 3.1.2. Geräte

Computer: Hewlett Packard Tischcomputer Modell 9830A

Hewlett Packard Plotter Modell 9862A

Hewlett Packard Printer Modell 9866A

Druckdialysekammer: Amicon

Photometer: Eppendorf Photometer Modell M1101

Eppendorf Kompensationsschreiber Modell 6511

Küvetten: Hella-Halbmikroküvetten aus optischem

Spezialglas

Potter: Braun, Melsungen

Ultraschallwandler: Branson Sonifier Modell B15

Zentrifugen: Eppendorf Tischzentrifuge 3200

Sorvall Ultraspeed refrigerated Laborzentrifuge

Modell RC-4B

Sorvall swing out Rotor HS-4

### 3.2. Methoden

#### 3.2.1. Herstellung von Antikörpern gegen den ANT

25 Meerschweinchen (Rasse "pur bright", weiblich, Gewicht ca. 1000 g) wurden mit aus Rinderherzen isoliertem ANT immunisiert. Die Isolierung des ANT erfolgte als CAT-Proteinkomplex, wie bei Riccio et al. (54,55) beschrieben. 1 mg CAT-Protein wurde in 5 ml Puffer I aufgenommen und mit 5 ml inkomplettem Freundschem Adjuvans gemischt.

Die Immunisierung der Versuchstiere erfolgte nach folgendem Schema:

| Zeitintervall | ANT-Menge | Applikationsart            |
|---------------|-----------|----------------------------|
|               | 50 µg     | s. c. (mehrfach am Rücken) |
| 2 Wochen      | "         | "                          |
| 2 Wochen      | "         | "                          |
| 6 Wochen      | "         | " + i. p.                  |
| 1 Woche       | "         | " "                        |
| 1 Woche       | "         | " "                        |
| 1 Woche       | "         | " "                        |
| 1 Woche       | "         | " "                        |
| 1 Woche *     | 75 µg     | " "                        |
| 1 Woche       | 150 µg    | " "                        |
| 1 Woche       | 75 µg     | " "                        |

\* Blutentnahme zur Antikörperbestimmung

### 3.2.2. Nachweis der Antikörper gegen den ANT

Die Messung der Bindung von Antikörpern am isolierten ANT erfolgte im Solid-Phase-Radioimmunoassay (61). Das Antigen, welches in 160 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 10 mM Mops (Morpholinopropanesulfonic Acid), 0,05 mM EDTA (Äthylendinitrotetraessigsäure Dinatriumsalz) und 0,5 % Triton X-100 gelöst war, lag in einer Konzentration von 0,5 mg Protein/ml vor. Je 90  $\mu\text{l}$  Antigenlösung wurden in die muldenförmigen Vertiefungen eisgekühlter Polyvinyl-Mikrotiterplatten eingebracht. Nach 2-stündiger Inkubation bei 4°C wurde das überschüssige Antigen abpipettiert. Anschließend erfolgten 3 Waschvorgänge mit zunächst 50  $\mu\text{l}$ , dann zweimal 100  $\mu\text{l}$  3%igem fetalem Kälberserum in Phosphatpuffer (PBS = phosphate buffered saline). Beim dritten Waschschriff wurde der Puffer 1 Stunde auf der Platte belassen, um alle noch nicht mit Antigen besetzten Bindungsstellen zu blockieren.

Je 80  $\mu\text{l}$  zu testendes Antiserum der Versuchstiere wurde 1:10 verdünnt aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Serum abgesaugt und die Platten erneut dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen.

Zur Erfassung der gebundenen Antikörpermenge wurden 75  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{J}$ -Protein A (19,40) in PBS mit einer Aktivität von 100000 cpm aufgetragen, 4 Stunden inkubiert, abgesaugt und die Platten erneut dreimal, wie beschrieben, gewaschen. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte im Gammazähler.

### 3.2.3. Funktionstest der Antikörper

Die Bestimmung der Hemmaktivität der nachgewiesenen Antikörper gegenüber dem ANT erfolgte durch Messung des Adeninnukleotidaustausches an Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln aus Meerschweinchenherzen. Mit Hilfe der "Inhibitor-stop-Methode" (50) wurde hierbei die Aktivität des ANT durch Messung des ADP-Transports über die innere mitochondriale Membran gemessen. Die verwendeten Pufferlösungen (Puffer I - IV) sind auf Seite 43 aufgelistet.

#### 3.2.3.1. Isolierung der Mitochondrien

Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte nach der von Smith beschriebenen Methode (73). Nach der Organentnahme wurden die Herzen zunächst in Puffer I aufgenommen und von größeren Gefäßen und Bindegewebsanteilen befreit. Anschließend wurden sie mit der Schere grob zerkleinert und mehrmals mit Puffer I gewaschen. Die weitere Zerkleinerung der Organe erfolgte nach Überführung in Puffer II zunächst erneut mit der Schere, danach durch Pottern bei 250 U/min. Nach mehrmaligem Pottern wurde der pH wieder auf 7,4 eingestellt, die Proben 10 min bei 600 g zentrifugiert. Es folgten Filtration des Überstandes durch Gaze, Zentrifugation bei 11000 g für 20 min und Waschen in Puffer II. Das Pellet wurde in Puffer III aufgenommen und der Proteingehalt nach Biuret bestimmt. Sämtliche Vorgänge werden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt.

### 3.2.3.2. Messung des Nukleotidtransportes

20 mg Mitochondrien wurden in 1 ml mit 40  $\mu$ l  $^{14}\text{C}$ -ADP (spez. Akt.: 42,6 mCi/mol) beladen, so daß die Radioaktivität 0,8  $\mu$ Ci pro Ansatz betrug. Nach 30 min Inkubation wurde der Ansatz mit Puffer III auf 40 ml verdünnt und bei 11000 g für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer IV aufgenommen, durch Pottern resuspendiert und auf 7,5 mg/ml verdünnt. Zu je 200  $\mu$ l Suspension wurden 15  $\mu$ l Serum (24 Std. gegen  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ -Puffer 20 mM dialysiert) in einer Konzentration von 10ml/g mitochondrialem Protein hinzugegeben. Die Blindproben enthielten kein Serum bzw. Normalhumanserum. Nach 30 min wurden je 20  $\mu$ l Succinat/Glutamat 350 mM und 10  $\mu$ l  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  350 mM zu den Proben gegeben und diese mit Puffer IV auf 1600  $\mu$ l aufgefüllt. Durch Zugabe von 10  $\mu$ l kaltem ADP, 10 mM, zu je 200  $\mu$ l Mitochondrien-Suspension wurde dann der Austausch gestartet. Aufgrund unterschiedlicher extra- und intramitochondrialer ADP-Konzentrationen kommt es zu einem Austausch von "heißem" ADP in den Mitochondrien gegen "kaltes" ADP im extramitochondrialen Raum. Dieser Transport wird nach 5 s durch Zugabe von CAT 2,5 mM gestoppt. Für die Kontrollwerte wird kein ADP, sondern gleich CAT dazugegeben. Ein zusätzlicher Ansatz wurde mit 20  $\mu$ l konzentrierter Perchlorsäure versetzt. Diese Probe liefert den Wert für die in den Mitochondrien enthaltene Gesamtradioaktivität von  $^{14}\text{C}$ -ADP (T-Wert). Nach Zentrifugation der Ansätze bei 8000 g für 5 min wurden vom Überstand je 150  $\mu$ l mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im beta-Zähler gemessen. Die Austauschrate errechnet sich aus der Gleichung:

$$\text{Austauschrate (\%)} = \frac{\text{Aktivität}_x - \text{Aktivität}_o}{\text{Aktivität}_T - \text{Aktivität}_o} \times 100$$

o = ohne ADP (Keine Austauschzeit)

x = nach 5 s Austauschzeit

Somit ergibt sich die Hemmung des Austausches zu:

$$\text{Hemmung (\%)} = \text{Austauschrate} \frac{(\text{Kontrolle}_x - \text{Probe}_x)}{\text{Kontrolle}_x} \times 100$$

#### 3.2.4. Das isoliert perfundiert arbeitende Herz

Vor der Entnahme der Herzen wurden die Meerschweinchen durch Eröffnen der Halsschlagader entblutet. Aus dem dabei gewonnenem Serum wurden erneut die Antikörpertiter sowie deren funktionelle Aktivität gegenüber dem ANT in vitro bestimmt.

Die Präparation der Meerschweinchenherzen erfolgte wie bei Neely und Binger beschrieben (47,7). Die isolierten Herzen wurden zunächst retrograd über die Aorta perfundiert. Das Perfusat ist ein nicht rezirkulierender Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer (Puffer V, S. 43), angereichert mit Pyruvat 0,3 mM, Glucose 5,5 mM, Insulin 5 U/l, und equilibriert mit Carbogen-Gas (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) bei 37°C.

Nach einer Adaptationszeit von wenigen Minuten wurden die Venen vorhofnah ligiert und die aortale Perfusion durch Perfusion über den linken Vorhof ersetzt. Die Regulierung des Perfusionsdruckes auf 12 cm H<sub>2</sub>O erfolgte durch ein Widerstandsventil. Der hydrostatische Druck im Überlaufsystem (80 cm Wassersäule) bestimmte den Widerstand, gegen den der linke Ventrikel Druck-Volumen-Arbeit verrichtete.

Vorhof- und Aortendruck wurden mit Statham Druckmeßköpfen registriert, die Herzfrequenz mit Hilfe eines Cardiotachometers erfaßt. Die Aufzeichnung der gewonnenen Druck- und Frequenzdaten wurde mit Hilfe eines Beckmann-Dynographen vorgenommen.

Folgende hämodynamischen Parameter wurden bestimmt:

|                     |                |
|---------------------|----------------|
| Aortenfluß          | (ml/(min x g)) |
| Koronarfluß         | (ml/(min x g)) |
| Herzfrequenz        | (1/min)        |
| Schlagvolumen       | (µl/g)         |
| Herz-Minutenvolumen | (ml/(min x g)) |
| Schlagarbeit        | (mJ/g)         |
| Herzarbeit          | (mJ/(min x g)) |

Aus der Summe von Aortenfluß und Koronarfluß ergibt sich die Gesamtmenge an Effluat, welche dem Perfusionsvolumen entspricht.

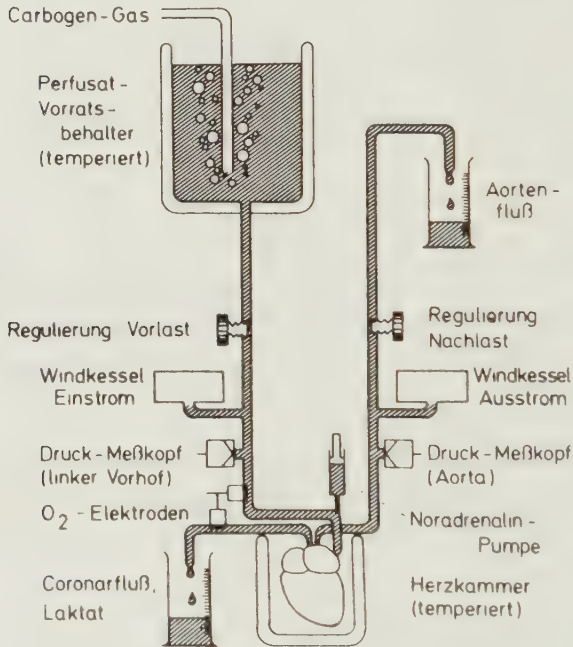
Mittels zweier teflonbeschichteter Platin-Silberelektroden, die den Sauerstoffgehalt im zu- und abfließenden Perfusat maßen, wurde der myokardiale Sauerstoffverbrauch ermittelt.

Eine Erhöhung der Schlagarbeit wurde über eine Stimulation der Herzen mit Noradrenalin (0,08 µM) nach einer weiteren Adaptationszeit von 30 min mittels einer Precidor-Pumpe erreicht. Die Belastungsphase dauerte etwa 20 min. Nachdem das Herz bezüglich Druck, Auswurfleistung und Sauerstoffverbrauch einen "steady state" erreicht hatte, wurde es entsprechend der im anschließenden Kapitel beschriebenen Weise schockgefroren.

Ein Schema der Working Heart Apparatur zeigt Abb. 1

Abb. 1:

## Schema der Working Heart Apparatur



Schema der Working Heart Apparatur zur isolierten Perfusion der Meerschweinchenherzen (nach Binger, 1979).

Die definierte Belastung der Herzen im Sinne einer Druck-Volumen Arbeit wird durch Regulierung der Vorlast (angebotenes Perfusatvolumen) und der Nachlast (Aortendruck), über Widerstandsventile im Perfusat-Zufluß und -Abfluß, erreicht. Eine pumpengesteuerte Noradrenalinzufuhr gewährleistet die kontrollierte Stimulation des Herzens.

### 3.2.5. Die Nicht-wäßrige Fraktionierung

#### 3.2.5.1. Frierstopp und Lyophilisation

Um einen raschen Stopp des Metabolismus zu gewährleisten werden die Stoffwechselvorgänge im Herzen durch Gefrierstopp mit Hilfe einer modifizierten Wollenbergerzange unterbrochen (82). Dabei wird das in der "Working Heart"-Apparatur schlagende Herz zwischen zwei in Flüssigstickstoff vorgekühlte Aluminiumblöcke gepreßt. Bei vollständigem Zusammenschlagen der Blöcke bleibt ein Spalt von 1 mm frei. Dadurch wird das Herz in eine Gewebsscheibe von 1 mm Dicke umgeformt. Die Aluminiumblöcke wiegen jeweils ca. 1 kg. Die Griffseite der Zange ist 50 cm lang. Der Drehpunkt liegt direkt hinter den Blöcken.

Die Gewebsscheibe wird von der Zange direkt in Flüssigstickstoff gegeben und dann in einem mit Flüssigstickstoff vorgekühlten Mörser grob zerrieben. Anschließend erfolgt die Gefriertrocknung der Gewebskrümel bei  $-40^{\circ}\text{C}$  über 48 Stunden bei 0,01 Torr. Nach der Lyophilisation ist eine Aufbewahrung des wasserfreien Pulvers bei unter  $-70^{\circ}\text{C}$  für mehrere Monate möglich, da eine Beeinflussung der Substratgehalte durch enzymatische Reaktionen nur in flüssiger Phase und nur über  $-30^{\circ}\text{C}$ , durch Umkristallisationsvorgänge nur über  $-50^{\circ}\text{C}$  auftritt.

### 3.2.5.2. Homogenisieren und Filtration

Das Aufbrechen der Membranen des Cytoplasmas und der Organellen erfolgt durch Ultraschall. Zum Beschallen wird das trockene Gewebepulver in unpolares Medium aufgenommen. Alle verwendeten derartigen Medien bestehen aus Heptan/Tetrachlorkohlenstoff (H/T) Gemischen. Beide Substanzen werden zum Schutz vor Feuchtigkeit über einem 4 Angström Molekularsieb wasserfrei gelagert. Durch Mischung des leichten Heptans (Dichte 0,69 g/ml) mit dem schwereren Tetrachlorkohlenstoff (Dichte 1,59 g/ml) lassen sich nichtwäßrige Medien unterschiedlicher Dichte herstellen.

Etwa 10 ml +4°C warmes H/T Gemisch der Dichte 1.23 g/ml werden zum Lyophilisat gegeben. Beschallt wird mit der flachen Arbeitsspitze, die eine hohe Leistungsabgabe ermöglicht, für die Dauer von 4 Minuten. Dabei wird nach je 5 s ein Pausenintervall von ebenfalls 5 s eingehalten, da kontinuierliches Beschallen zur Aufheizung des Probenmaterials auf über +4°C führt. Die Wärmeabfuhr erfolgt durch einen die Schallkammer umgebenden trocken eisgekühlten Heptanmantel (ca. -70°C).

Im Anschluß wird das Gewebshomogenat über eine zweistufige Glasperlensäule filtriert. Diese besteht aus zwei etwa 10 cm hohen Schichten Glasperlen von 1 mm und 0,4 mm Durchmesser. Nach der Filtration werden von den ca. 30 ml Filtrat zwei Aliquots von je 1 ml entnommen, die nicht der Gleichgewichts-Zentrifugation unterworfen werden. Dieses Material wird Gesamtfraktion (G-Fraktion) genannt, da die aus ihm bestimmten Metabolitgehalte und Enzymaktivitäten mit dem Mittelwert der entsprechenden Gehalte und Aktivitäten aller Fraktionen

des Gradienten übereinstimmen müssen. Die G-Fraktion zeigt also Enzymaktivitätsverluste und Substratverschiebungen, die während der Gleichgewichts-Zentrifugation auftreten könnten, an. Darüber hinaus sind die Proteinmenge und der Substratgehalt der G-Fraktion entscheidend zur Bestimmung der intrazellulären Metabolitgehalte, da die aus den Fraktionen des Dichtegradienten gewonnenen Daten nur Aufschluß über die relative Verteilung der Metabolite in den einzelnen Kompartimenten geben können.

### 3.2.5.3. Gleichgewichts-Zentrifugation und Fraktionierung

H/T Gemische der Dichten 1,29 g/ml und 1,38 g/ml liefern die Ausgangsmedien des Dichtegradienten. Bei Vorgabe von etwa 5 ml schwereren Mediums und unter Zufluß des leichteren Gemisches in die Mischkammer eines Gradientenmischers ergibt sich in einem ca. 10 ml fassenden Polyäthylen-Zentrifugenröhrchen ein logarithmischer Dichtegradient von rund 0,08 g/ml Dichteunterschied über den gesamten Gradienten (siehe Abb. 2).

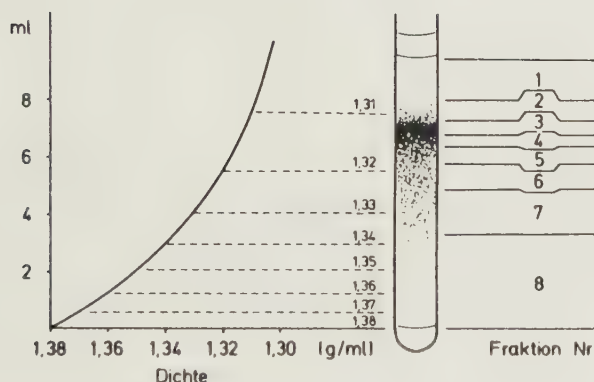
Das filtrierte Homogenat läßt man 10 min bei 16000 g sedimentieren. Anschließend wird es in 2 ml H/T-1,23 g/ml resuspendiert und auf zwei Dichtegradienten geschichtet. Die Gleichgewichts-Zentrifugation im swing out Rotor dauert 4 Stunden bei ebenfalls 16000 g. Unter Einwirken der Schwerkraft haben sich nach dieser Zeit sämtliche Gewebspartikel im Gradienten am Ort ihrer jeweiligen Dichte angesammelt.

Durch Absaugen des aufgetrennten Homogenats werden 8 Fraktionen mit unterschiedlichem mitochondrialen und cytosolischen Membrangehalt

gewonnen. Diese Fraktionen sollten etwa gleichen Proteingehalt haben. Sie werden in je zwei Aliquots, getrennt für Enzym- und Substratbestimmungen aufgeteilt. Zur Aufnahme der Aliquots, deren Menge genau vermerkt werden muß, dienen Eppendorf Reaktionsgefäße. Diese sind vorher mit einer Spatelspitze gewaschenem und *geglühtem* Quarzsand versehen worden. Der Quarz dient dazu, die Proben später leichter und homogener in wäßriger Lösung aufschütteln zu können. Die Reaktionsgefäße werden mit Heptan aufgefüllt, in der Tischzentrifuge bei 3000 U<sub>pm</sub> 2 min zentrifugiert und das H/T Gemisch abgesaugt. Der Rest des unpolaren Mediums wird durch mindestens 10-stündige Lagerung der Proben in einem entlüfteten Exsiccator über Blaugel entfernt.

Abb. 2:

## Aufbau und Fraktionierung des Dichtegradienten



Darstellung des Aufbaues eines Dichtegradienten in den verwendeten ca. 11 ml fassenden Zentrifugenröhrchen.

Die Schichtung des Gradienten wird durch kontinuierliche Mischung von 5 ml Heptan-Tetrachlorkohlenstoff der Dichte 1,38 g/ml mit Heptan-Tetrachlorkohlenstoff der Dichte 1,29 g/ml erreicht. Nach der Gleichgewichtszentrifugation zeigt die Trübung im Gradienten, hier durch Punktierung wiedergegeben, die Verteilung der Membranfragmente. Aus dieser Verteilung ergibt sich das Volumen der einzelnen Fraktionen des Gradienten, die alle etwa gleichen Membrangehalt haben sollen.

### 3.2.6. Durchführung der Messungen

Alle Arbeitsschritte werden generell im Eiswasserbad ausgeführt.

Vorbereitung der Proben:

a) "Enzym"-Aliquot, zur Bestimmung von:

Protein,  
Citratsynthase,  
Phosphoglyceratkinase.

Zu den Proben wird je 0,5 ml eisgekühlte Phosphatlösung 0,25 mM gegeben. Das Probenmaterial wird anschließend im Rüttler 4 x 30 s aufgeschüttelt. Zwischen jedem Schüttelvorgang wird je 30 s im Eisbad gekühlt. Nach Zugabe von 0,5 ml eisgekühlter Phosphatlösung 100 mM sind die Ansätze meßbereit. Sie müssen nur direkt vor Entnahme des Materials zum Beschicken der Meßküvette noch einmal kurz aufgeschüttelt werden.

b) "Substrat"-Aliquot, zur Bestimmung von:

Phosphat,  
ATP,  
ADP,  
Kreatinphosphat,  
Kreatin.

Die Proben müssen zunächst zur Denaturierung der Enzyme mit 0,5 ml eisgekühlter Perchlorsäure 0,6 M versetzt werden. Dann werden sie 2 x 30 s geschüttelt, wobei auch hier eine 30 s lange Kühlpause

zwischengeschaltet ist. In der Tischzentrifuge erfolgt anschließend die Sedimentation von Membranen und denaturierten Enzymen bei 3000 U<sub>pm</sub> für 2 min. Die löslichen Substrate sind im klaren Überstand enthalten, von dem je 430 µl abpipettiert und mit etwa 50 - 52 µl Triäthanolamin 1M - KOH 6M neutralisiert werden (pH 7,0). Danach werden die Probenansätze erneut in der Tischzentrifuge 2 min lang zentrifugiert, um das ausgefallene KCl sedimentieren zu lassen.

Die Messungen werden in Küvetten aus optischem Spezialglas bei 25°C durchgeführt.

Die Proteinbestimmung erfolgt nach der Methode von Lowry (41), alle anderen Tests wurden enzymatisch entsprechend der bei Bergmayer (5) und Lowry-Passoneau (42) angegebenen Verfahren ausgeführt.

## 1. Protein

spezielle Vorbereitung der Proben: 10 min mit 2 N NaOH  
im Verhältnis 1:1 kochen.

Testgemisch: 200 Teile  $\text{NaCO}_3$  2% + 1 Teil Tartrat 2%  
+ 1 Teil  $\text{CuSO}_4$  1%

Testansatz: 1 ml Testgemisch

Start: 50  $\mu\text{l}$  gekochte Probe

Reaktionszeit: 15 min

danach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Folin-Ciocalteus Reagenz  
(1:1 in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.)

weitere 15 min reagieren lassen

Filter: 578 nm

### Nachweisgrenze und Empfindlichkeit:

Die Umrechnung von Extinktion in Proteinkonzentration erfolgt durch quadratische Regression einer Eichkurve aus Standardwerten aus Rinderserumalbumin. Es können etwa 5  $\mu\text{g}$  Protein/ml nachgewiesen werden. Die Genauigkeit der Messungen beträgt etwa  $\pm 1,5\%$ .

## 2. Citrat-Synthase (CS)

Testgemisch: Triäthanolamin-Puffer 100 mM, pH 8,4

Testansatz: 750 µl Testgemisch

20 µl L-Malat, 140 mM

20 µl APAD (Acetylpyridin-Adenin-Dinukleotid), 10 mM

10-100 µl Probe

20 µl Malat-Dehydrogenase (1:10 verdünnt mit H<sub>2</sub>O.)

Start: 20 µl Acetyl-Koenzym-A, 8,4 mM

Filter: 366 nm

## 3. Phosphoglycerat-Kinase (PGK)

Testgemisch: 500 Teile Triäthanolamin-Puffer 100 mM, pH 7,6

5 Teile EDTA, 100 mM

1 Teil MgSO<sub>4</sub>, 1M

Testansatz: 750 µl Testgemisch

20 µl NADH, 7,5 mM

10 µl Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH)

50 µl Glycerin-3-phosphat, 200 mM

10-100 µl Probe

Start: 20 µl ATP, 200 mM

Filter: 334 nm

Die Enzymaktivität ergibt sich aus der Extinktionsänderung/min der ersten 5 Minuten (linearer Verlauf). Die Genauigkeit der gemessenen Werte beträgt ca.  $\pm 2\%$ .

### 5. ADP und Kreatin

Testgemisch: 120 ml Triäthanolamin-Puffer, 100 mM, pH 7,6

340  $\mu$ l  $MgCl_2$ , 1 M

840  $\mu$ l KCl, 1 M

28 mg Phosphoenolpyruvat

Testansatz: 500  $\mu$ l Testgemisch

100  $\mu$ l Probe

10  $\mu$ l NADH, 7,5 mM

5  $\mu$ l Laktat-Dehydrogenase (LDH)

Start ADP: 5  $\mu$ l Pyruvat-Kinase (PK)

pH 9 mit 5  $\mu$ l  $K_2CO_3$  (gesättigt) einstellen

5  $\mu$ l ATP, 200 mM

Start Kreatin: 10  $\mu$ l Kreatin-Kinase

(4 mg Enzym in 100  $\mu$ l  $Na_2CO_3$ , pH 9 lösen)

Filter: 334 nm

### 6. ATP und Kreatinphosphat

Testgemisch: 100 ml Triäthanolamin-Puffer, 100 mM, pH 7,6

1 ml  $MgCl_2$ , 1 M

33 mg Hydrazinsulfat

372 mg Glycerat-3-phosphat (tri-Natriumsalz)

2 ml EDTA, 100 mM

Testansatz: 500  $\mu$ l Testgemisch

10  $\mu$ l NADH, 7,5 mM

100  $\mu$ l Probe

Start ATP: 2  $\mu$ l GAP-DH + PGK (1:2)

10  $\mu$ l ADP, 1mM

Start Kreatinphosphat: 10  $\mu$ l Kreatin-Kinase (siehe oben)

Filter: 334 nm

### 7. Phosphat

Testgemisch: 10 ml Imidazolpuffer, 50 mM, pH 7,0

1 ml NADH, 10 mM

10  $\mu$ l AMP, 10 mM

10  $\mu$ l Glucose-1,6-Diphosphat, 0,5 mM

60  $\mu$ l Mg-Acetat, 100 mM

100  $\mu$ l Glycogen, 80 mg/ml, dialysiert

200  $\mu$ l Dithiothreitol, 20 mM

Testansatz: 550  $\mu$ l Testgemisch

5  $\mu$ l Phosphorylase a, 5 mg/ml, dialysiert

5  $\mu$ l Phosphoglucomutase, 2 mg/ml

50  $\mu$ l Probe

15 min inkubieren

Start: 5  $\mu$ l Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, 1mg/ml

Filter: 334 nm

### Empfindlichkeit und Genauigkeit der Substratteste:

Die Standardabweichung bei Kontrollmessungen lag zwischen 0,5 und 1,3 mE, die Ablesegenauigkeit der Einzelmessung und die Nachweisgrenze betrugen ca. 1 mE. Umgerechnet auf Küvettenkonzentrationen bedeutet dies, daß sowohl die Abweichung als auch die Nachweisgrenze bei ca. 0,2 nM liegen, das entspricht einer Konzentration im Probenmaterial von etwa 2 nM.

### 3.2.7. Berechnung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen

Die durch den Beschallungsvorgang entstandenen Partikel bestehen nicht nur aus Membranbruchstücken einer einzigen Organelle. Reine Mitochondrien-, reine Kernteile usw. sind in elektronenmikroskopischen Aufnahmen des beschallten Homogenats kaum zu sehen (13). In der Regel besteht ein Partikel aus Membranen verschiedener Art. Eine vollständige Trennung der Mitochondrienbruchstücke vom übrigen Zellmaterial ist demnach nicht möglich. Man erreicht in der Gradientenzentrifugation beispielsweise innerhalb der leichteren Fraktionen lediglich eine Anreicherung mitochondrialer Strukturen gegenüber cytosolischen. Diese Teilabtrennung variiert jedoch über einen großen Bereich, so daß durch ein computergesteuertes Rechenprogramm die getrennte Konzentrationsberechnung inner- und extramitochondrialer Metabolite möglich ist.

#### Bedeutung der Leitenzyme:

Eine genaue Kenntnis über das Verhältnis der Menge mitochondrialen und cytosolischen Materials in jeder einzelnen Fraktion ist Voraussetzung für die Berechnungen. Es existieren für nahezu jedes Organell der Zelle spezifische Enzyme, mit deren Hilfe sie die ihnen eigenen Stoffwechselaufgaben erfüllen. Solche Enzyme kommen nur in diesem bestimmten Organell vor und werden hier als Leit- oder Kennenzyme bezeichnet.

Als Leitenzym für das mitochondriale Kompartiment hat sich die einfach und genau zu messende Citratsynthase (CS) erwiesen, welche im Citrat-Cyklus, also nur im Mitochondrium vorkommt. Im Cytosol ist ein

Glykolyseenzym, die Phosphoglyceratkinase (PGK) für dieses Kompartiment spezifisch und gut bestimmbar (siehe Abb. 3).

Während des Lyophilisationsvorganges kondensieren, wie bereits beschrieben, Enzyme und Substrate an den ihnen zugehörigen Membranen. Entsprechend der direkten Beziehung zwischen Enzym- und Membrananteilen gibt die spezifische Aktivität des Kennenzym ein relatives Maß des Gehaltes mitochondrialer und cytosolischer Elemente in den Einzelfractionen und der G-Fraktion an. Die Citratsynthase schlägt sich an der Innenseite der inneren mitochondrialen Membran nieder, die PGK an allen Membranstrukturen des Cytosols einschließlich der Außenseite der äußeren mitochondrialen Membran.

Eine Zunahme der spezifischen CS-Aktivität von einer Fraktion zur nächsten zeigt also eine Zunahme des Anteils innerer mitochondrialer Membranen an. Der Absolutwert an mitochondrialem Material bleibt jedoch unbekannt. Bei einer Verdopplung der CS-Aktivität könnte der mitochondriale Anteil von 1:10 auf 2:10, oder von 1:3 auf 2:3 gestiegen sein. Auch der Substratgehalt einer Fraktion besteht aus einem cytosolischen und einem mitochondrialen Anteil, welcher durch das Verhältnis der Membrananteile festgelegt ist, folglich also direkt mit den PGK- und CS-Aktivitäten korreliert. Bei den Substratgehalten können ebenfalls nur relative Änderungen von Fraktion zu Fraktion bestimmt werden, nicht jedoch Absolutwerte.

Eine typische Auftrennung der Leitenzyme in einem Gradienten zeigt Abbildung 3.

Abb. 3:

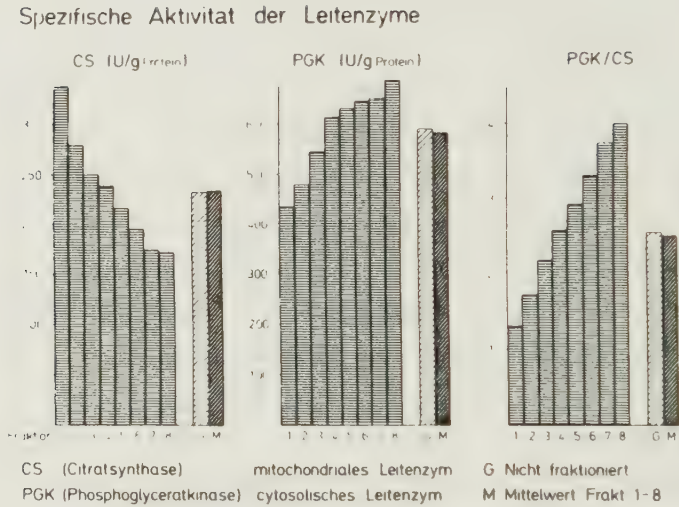


Diagramm der spezifischen Aktivitäten und der Verhältnisse der Leitenzyme in den Fraktionen 1-8 des Dichtegradienten und in einem Aliquot aus Membranpartikeln ohne Gleichgewichtszentrifugation (G). M gibt den errechneten Mittelwert aus den einzelnen Fraktionen an. Als mitochondriales Leitenzym dient die Citratsynthase (CS), als cytosolisches Leitenzym die Phosphoglyceratkinase (PGK).

Zusammenfassend läßt sich also sagen:

Bekannt ist die totale Konzentration des Metabolits  $M_{\text{tot}}$  in jeder Fraktion und im Gesamtgradienten.

$M_{\text{tot}}$  setzt sich aus einem unbekannten cytosolischen und mitochondrialen Anteil zusammen:

$$(1) \quad M_{\text{tot}} = M_{\text{cyt}} + M_{\text{mit}}$$

Bekannt ist auch der Gehalt an Kennenzym, das bezüglich des Membran-, aber auch des Metabolitanteils seines Kompartiments in einem festen Verhältnis für das Cytosol (a) und für das Mitochondrium (b) steht:

$$(2) \quad a = M_{\text{cyt}} / \text{PGK}$$

$$(3) \quad b = M_{\text{mit}} / \text{CS}$$

Gleichung 1-3 enthalten 4 Unbekannte:  $M_{\text{cyt}}$ ,  $M_{\text{mit}}$ , a und b.

$M_{\text{cyt}}$  und  $M_{\text{mit}}$  sind aus ihnen nicht direkt zu errechnen.

Eine Umformung der Gleichungen (2) und (3) liefert:

$$(2') \quad M_{\text{cyt}} = a \times \text{PGK}$$

$$(3') \quad M_{\text{mit}} = b \times \text{CS}$$

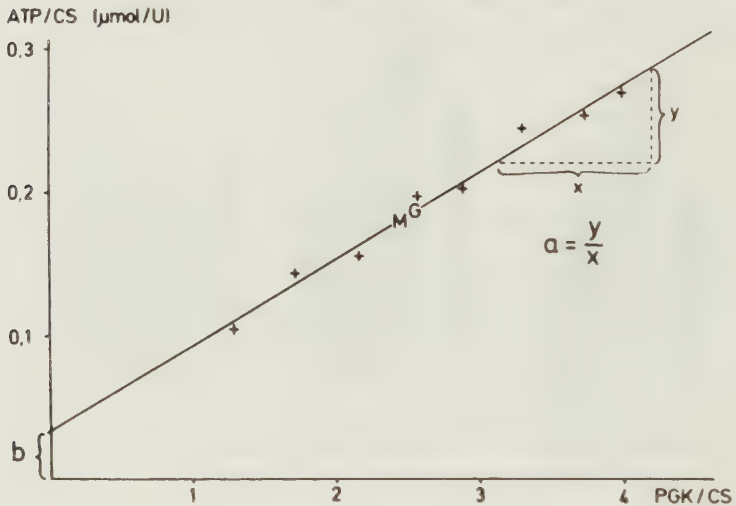
Einsetzen von (2') und (3') in (1) führt zum Ausdruck:

$$(4) \quad M_{\text{tot}} = a \times \text{PGK} + b \times \text{CS}$$

$$(4') \quad M_{\text{tot}} / \text{CS} = a \times \text{PGK} / \text{CS} + b$$

Abb. 4:

### Lineare Regression zur Bestimmung der Faktoren a und b



Graphische Darstellung der linearen Regression zur Bestimmung der Faktoren a und b für die Berechnung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen (hier beispielsweise des ATP).

Die Enzymaktivitäten und Metabolitgehalte jeder Fraktion liefern im Koordinatensystem (PGK:CS/ATP:CS) Punkte (+), aus denen die Ausgleichsgerade bestimmt wird. M stellt den errechneten Mittelwert aller Fraktionen des Gradienten dar, G den Wert eines Aliquots aus nicht-fraktioniertem Membrangemisch.

Der Term (4') gibt die Gleichung einer Geraden an mit  $a$  als Steigungsfaktor und  $b$  als Ordinatenschnittpunkt. (Die Problematik bei der Ermittlung der Geraden wird in Abschnitt 5.1. behandelt.) Ist diese Gerade bekannt, also auch  $a$  und  $b$ , lassen sich aus den Gleichungen (2') und (3') die gesuchten Konzentrationen  $M_{\text{cyt}}$  und  $M_{\text{mit}}$  angeben.

Eine derartige Gerade ist in Abbildung 4 mit ATP als Substrat dargestellt. Durch Gleichung (4') ist ein Koordinatensystem mit  $\text{PGK}/\text{CS}$  als Abszissen- und  $M_{\text{tot}}/\text{CS}$  als Ordinateneinheit festgelegt. Jede Fraktion liefert in diesem Koordinatensystem genau einen Punkt, wenn ihre Meßwerte zu den entsprechenden Quotienten der X- und Y-Koordinate zusammengefaßt werden.

Die mittels der Ausgleichsgeraden bestimmten Faktoren  $a$  und  $b$  liefern aus den Gleichungen (2) und (3) den cytosolischen und mitochondrialen Gehalt des gemessenen Metaboliten und des Proteins, so daß gilt:

$$(2') \quad M_{\text{cyt}} = a \times \text{PGK}_G / \text{Protein}_{\text{cyt}} \quad (\text{nmol/mg Protein})$$

$$(3') \quad M_{\text{mit}} = b \times \text{CS}_G / \text{Protein}_{\text{mit}} \quad (\text{nmol/mg Protein})$$

$\text{PGK}_G$  und  $\text{CS}_G$  sind die Aktivitäten aus der G-Fraktion, die die Daten im Gesamtmaterial, und nicht in einer Einzelfraktion liefert.

Die Rückrechnung der Metabolitgehalte in Konzentrationen erfolgt durch Division mit den Werten für den Wassergehalt pro Gramm Protein:

3,8 ml/g cytosolisches Protein (76),

1,8 ml/g mitochondriales Protein (25).

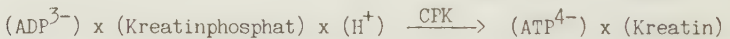
Der Konzentrationsterm des Phosphorylierungspotentials lautet:

$$-RT \ln \frac{(ATP)}{(ADP) \times (Phosphat)}$$

wobei R die Faraday-Konstante

und T die absolute Temperatur des Perfusionsmediums ist.

Da im Cytosol der Herzmuskelzelle ein großer Teil des ADP an Aktin und Myosin gebunden ist (71), finden sich zu niedrige cytosolische ATP/ADP-Quotienten. Um die allein maßgebliche Konzentration an freiem cytosolischem ADP zu erhalten wird diese aus der Kreatinphosphokinase-Reaktion ermittelt:



Bei einer Gleichgewichtskonstante von  $K_{CPK} = 2,04 \times 10^{-9}$  (3)

und einer intrazellulären Protonenkonzentration von pH 7,05 (78,56) ergibt sich das Verhältnis von freiem ATP/ADP im Cytosol:

$$\frac{(ATP^{4-})}{(ADP^{3-})} = \frac{(Kreatinphosphat) \times 10^{-7,05}}{(Kreatin) \times 2,04 \times 10^{-9}}$$

Die angegebenen Werte für das Phosphorylierungspotential des ATP über der inneren mitochondrialen Membran sind die Differenz aus cytosolischem und mitochondrialem Konzentrationsterm.

### 3.2.8. Pufferlösungen

Puffer I: 160 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   
10 mM MOPS  
0,05 mM EDTA  
0,5 % Triton X  
0,05 %  $\text{NaN}_3$

Puffer II: 250 mM Saccharose  
2 mM EGTA (Äthylglykol-bis-Essigsäure)  
mit KOH auf pH 7,4 eingestellt

Puffer III: 250 mM Saccharose  
5 mM Tris/HCl  
1 mM EDTA  
pH 7,4

Puffer IV: 250 mM Saccharose  
10 mM MOPS  
0,5 mM EDTA  
2 mM  $\text{MgCl}_2$   
pH 7,4

Puffer V: 127 mM NaCl  
4,7 mM KCl  
24,9 mM NaHCO<sub>3</sub>  
1,25 mM CaCl<sub>2</sub>  
0,6 mM MgSO<sub>4</sub>  
1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Phosphatpuffer 100 mM:  
1830 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3 H<sub>2</sub>O  
180 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
in 100 ml H<sub>2</sub>O  
pH 7,5

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer: 10 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 M  
90 ml NaHCO<sub>3</sub>, 0,1 M  
pH 9,0

#### 4. Ergebnisse

##### 4.1. Antikörpertiter und Hemmung des Nukleotidaustausches in vitro

Während des Immunisierungszeitraumes starben 4 der 25 Versuchstiere. Bei den übrigen 21 Tieren wurde der Antikörpertiter gegen den ANT im Solid-Phase-Radioimmunoassay bestimmt. Dabei ist die Höhe der gemessenen Radioaktivität (counts/min) proportional der Antikörpermenge, die am Antigen der Mikrotiterplatte gebunden ist. Diese wiederum ist proportional der Antikörper-Serumkonzentration, also dem Titer. Die Seren der acht Tiere mit den höchsten Titern, als Ak 1-8 bezeichnet, wurden darüberhinaus bezüglich ihrer in vitro Hemmung des Nukleotidaustausches untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt, wobei bei den Angaben der Titerhöhen die Radioaktivität des Kontrollwerts (2050 cpm) bereits abgezogen wurde.

Tabelle 1:

| Tier Nr | Antikörpertiter (cpm) | Hemmung des ADP-Austausches (%) |
|---------|-----------------------|---------------------------------|
| Ak 1    | 900                   | -                               |
| Ak 2    | 970                   | -                               |
| Ak 3    | 2500                  | ++ (>50 %)                      |
| Ak 4    | 3200                  | + (>10 %)                       |
| Ak 5    | 4780                  | -                               |
| Ak 6    | 3630                  | +                               |
| Ak 7    | 5690                  | -                               |
| Ak 8    | 2670                  | ++                              |

#### 4.2. Hämodynamik und anaerobe Glykolyse

Vor der Messung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen wurden von den acht ausgewählten "Antikörpertieren" hämodynamische Daten mit Hilfe des "Working Heart" bestimmt, der myokardiale Sauerstoffverbrauch gemessen und die Laktatfreisetzung als Maß der Glykolyseaktivität bestimmt. Die Herzen von 5 "gesunden", nicht immunisierten Meerschweinchen, den Antikörpertieren in Rasse, Geschlecht, Alter und Gewicht gleich, wurden als Kontrollkollektiv (Ko 1-5) mituntersucht.

Die gewonnenen Daten sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Von Tier Ak 6 sind keine Werte angegeben, da das Herz während des Versuchs undicht wurde, eine exakte Bestimmung der hämodynamischen Parameter also nicht möglich war. Der extrem niedrige Wert der Herzarbeit bei Ak 5 beruht - bei normalem myokardialen Sauerstoffverbrauch und normaler Laktatfreisetzung - mit großer Wahrscheinlichkeit auf einem Meßfehler und wird deshalb vernachlässigt.

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den immunisierten Tieren und den Kontrollen:

|                                                   |                     |                          |
|---------------------------------------------------|---------------------|--------------------------|
| Herzarbeit (mJ/(g x min)):                        | Ko. 637 $\pm$ 102   | Ak-Tiere 648 $\pm$ 95    |
| O <sub>2</sub> -verbrauch ( $\mu$ mol/(g x min)): | Ko. 11,9 $\pm$ 4,9  | Ak-Tiere 11,9 $\pm$ 2,7  |
| Laktatproduktion ( $\mu$ mol/(g x min)):          | Ko. 0,67 $\pm$ 0,21 | Ak-Tiere 0,83 $\pm$ 0,40 |

Die Laktatkonzentration im Koronareffluat liegt bei Ak 8 mit 1,72  $\mu$ mol/(g x min) weit über den Kontrollen und zeigt eine erhöhte Glykolyseaktivität bei diesem Tier an.

Tabelle 2:

| Tier Nr. | Herzarbeit<br>(mJ/(g x min)) | myokard. O <sub>2</sub> -Verbr.<br>(μmol/(g x min)) | Laktatproduktion<br>(μmol/(g x min)) |
|----------|------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Ko 1     | 465                          | 5,2                                                 | 0,40                                 |
| Ko 2     | 696                          | 17,2                                                | 0,64                                 |
| Ko 3     | 637                          | 11,6                                                | 0,78                                 |
| Ko 4     | 662                          | 9,5                                                 | 0,56                                 |
| Ko 5     | 725                          | 16,2                                                | 0,96                                 |
| Ak 1     | 591                          | 6,4                                                 | 0,47                                 |
| Ak 2     | 560                          | 11,1                                                | 0,71                                 |
| Ak 3     | 840                          | 12,5                                                | 0,67                                 |
| Ak 4     | 745                          | 14,9                                                | 0,78                                 |
| Ak 5     | (282)                        | 13,5                                                | 0,71                                 |
| Ak 6     | -                            | -                                                   | -                                    |
| Ak 7     | 705                          | 12,7                                                | 0,76                                 |
| Ak 8     | 749                          | 12,3                                                | 1,72                                 |

Berechnung der Herzarbeit (HW):

HW = Druck-Volumen-Arbeit + Beschleunigungs-Arbeit

$$HW = P \times V + 1/2 m \times v^2$$

P = Aortaler Mitteldruck - Mitteldruck des linken Vorhofs

V = Herzzeitvolumen

m = Schlagvolumen x Dichte

v = Schlagvolumen / (Aortenquerschnitt x Austreibungszeit)

#### 4.3. Intrazelluläre Metabolitkonzentrationen

Die Ergebnisse der Nicht-wässrigen Fraktionierung sind im einzelnen in den Tabellen 4 - 6 und den Abbildungen 5 und 6 dargestellt.

Tabelle 3 zeigt zusammengefaßt die mittleren Konzentrationen der bestimmten Substanzen (mM), die ATP/ADP-Verhältnisse und die Phosphorylierungspotentiale (kJ/mol). Die Nummern der Antikörper-Tiere und deren Substratkonzentrationen (in Klammern), die sich auffällig, also um mehr als das Doppelte der Standardabweichung ( $> \pm 2s$ ) vom Mittelwert des Normalkollektivs unterscheiden, sind in der rechten Spalte angegeben:

Tabelle 3:

| Substrat            | Mittelwerte<br>Kontrollen | Ak-Tiere mit Abweichungen über 2s<br>(*: über 3s) vom Kontrollkollektiv                                   |
|---------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Phosphat (mM)       | 11,3 cyt<br>5,7 mit       | Ak 3 (12,7), Ak 6 (12,3)                                                                                  |
| ATP (mM)            | 13,2 cyt<br>8,2 mit       | Ak 3 (8,8), Ak 8 (7,9)<br>Ak 3 (26,5)*, Ak 6 (13,6), Ak 8 (24,4)*                                         |
| ADP (mM)            | 2,0 cyt<br>1,6 mit        | Ak 2 (3,0)<br>Ak 6 (0,8)*                                                                                 |
| Kreatin-Ph.<br>(mM) | 26,1 cyt<br>0,0 mit       | Ak 8 (13,2)*<br>Ak 3 (7,5), Ak 6 (12,5), Ak 8 (28,7)                                                      |
| Kreatin (mM)        | 18,6 cyt<br>18,9 mit      | Ak 2 (29,2)*                                                                                              |
| ATP/ADP             | 61,8 cyt<br>5,1 mit       | Ak 2 (42), Ak 8 (40)<br>Ak 1 (7,4)*, Ak 2 (9,5)*, Ak 3 (21,5)*,<br>Ak 4 (6,2), Ak 6 (17,0)*, Ak 8 (23,1)* |
| dG (kJ/mol)         | 22,2 cyt<br>17,6 mit      | Ak 2 (21,2)*, Ak 8 (21,0)*<br>Ak 2 (19,3), Ak 3 (22,0)*, Ak 4 (6,2)*,<br>Ak 6 (20,4)*, Ak 8 (22,1)*       |
| ddG (kJ/mol)        | 4,6 cyt-mit               | Ak 2 (1,9)*, Ak 3 (-0,4)*,<br>Ak 6 (1,6)*, Ak 8 (-1,1)*                                                   |

Tabelle 4:

Intrazelluläre Metabolitkonzentrationen - CYTOSOL

| Tier Nr.   | Protein %      | Phosphat [mM]    | ATP [mM]         | ADP [mM]       | Kreatin-<br>phosphat | Kreatin [mM]     |
|------------|----------------|------------------|------------------|----------------|----------------------|------------------|
| Ko 1       | 63 (63/63)     | 11,1 (11,5/10,8) | 12,0 (11,9/12,9) | 1,7 (1,8/2,0)  | 25,1 (25,5/25,4)     | 18,0 (17,5/17,4) |
| Ko 2       | 67 (66/67)     | 11,6 (11,5/11,9) | 14,8 (15,0/15,5) | 2,6 (2,6/2,7)  | 23,2 (23,4/23,5)     | 19,6 (20,4/17,9) |
| Ko 3       | 65 (65/66)     | 10,6 (10,5/10,6) | 12,1 (12,4/11,4) | 2,1 (2,1/2,0)  | 29,6 (29,3/31,9)     | 22,6 (22,6/23,0) |
| Ko 4       | 66             | 11,3             | 11,2             | 1,5            | 22,1                 | 14,4             |
| Ko 5       | 66             | 11,7             | 15,9             | 2,0            | 30,3                 | 18,5             |
| <hr/>      |                |                  |                  |                |                      |                  |
| MW $\pm$ s | 65,4 $\pm$ 1,5 | 11,3 $\pm$ 0,44  | 13,2 $\pm$ 2,0   | 2,0 $\pm$ 0,42 | 26,1 $\pm$ 3,72      | 18,6 $\pm$ 3,0   |
| <hr/>      |                |                  |                  |                |                      |                  |
| AK 1       | 63 (62/63)     | 10,8 (11,0/10,4) | 15,0 (15,3/14,6) | 2,6 (2,4/2,5)  | 28,9 (29,3/32,5)     | 24,7 (25,4/23,9) |
| AK 2       | 66 (64/65)     | 11,2 (11,6/11,5) | 15,7 (15,2/15,9) | 3,0 (3,1/2,9)  | 28,2 (28,5/28,6)     | 29,2 (29,3/27,8) |
| AK 3       | 67 (69/64)     | 12,7 (12,8/13,7) | 8,8 (8,6/9,6)    | 2,2 (2,2/2,3)  | 23,5 (22,7/25,2)     | 18,6 (18,3/19,2) |
| AK 4       | 65 (65/65)     | 11,5 (11,7/11,4) | 17,1 (16,2/17,3) | 2,0 (2,0/2,0)  | 36,5 (36,1/36,5)     | 22,3 (21,9/23,3) |
| AK 5       | 63 (65/63)     | 12,2 (11,5/12,3) | 14,7 (14,6/14,7) | 2,2 (2,1/2,2)  | 32,3 (32,2/32,2)     | 19,6 (18,9/20,2) |
| AK 6       | 66 (68/63)     | 12,3 (12,0/12,7) | 11,0 (10,7/11,7) | 2,3 (2,0/2,5)  | 20,5 (18,7/22,0)     | 14,0 (14,3/14,3) |
| AK 7       | 62 (62/62)     | 10,7 (10,2/10,7) | 13,2 (13,7/12,6) | 1,9 (2,0/1,8)  | 29,0 (31,3/28,8)     | 22,9 (22,5/32,1) |
| AK 8       | 68 (67/67)     | 11,5 (11,3/11,9) | 7,9 (8,7/8,1)    | 2,2 (2,1/2,3)  | 13,2 (14,0/15,8)     | 14,5 (14,2/14,5) |

Werte in Klammern: Doppelbestimmung bei zwei Gradienten pro Tier

Tabelle 5:

Intrazelluläre Metabolitkonzentrationen - MITOCHONDRIMUM

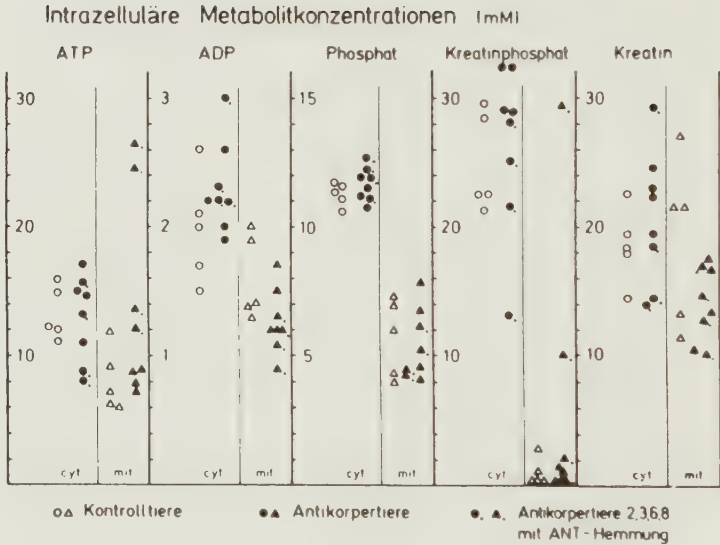
| Tier Nr. | Protein %  | Phosphat [mM] | ATP [mM]         | ADP [mM]      | Kreatin-<br>phosphat | Kreatin [mM] | Kreatin [mM]     |
|----------|------------|---------------|------------------|---------------|----------------------|--------------|------------------|
| Ko 1     | 37 (37/37) | 4,3 (3,9/5,6) | 9,2 (8,0/8,0)    | 1,9 (1,8/1,5) | -                    | ( - / - )    | 13,2 (16,0/ 7,8) |
| Ko 2     | 33 (34/33) | 7,2 (6,8/6,6) | 11,8 (9,2/11,3)  | 2,0 (2,0/1,6) | -                    | ( - / 1,1)   | 21,5 (20,5/25,7) |
| Ko 3     | 35 (35/34) | 6,0 (6,6/5,6) | 6,3 (5,8/8,1)    | 1,4 (1,4/1,5) | -                    | ( - / - )    | 26,9 (25,9/26,5) |
| Ko 4     | 34         | 7,0           | 7,3              | 1,4           | -                    | -            | 11,5             |
| Ko 5     | 34         | 4,0           | 6,2              | 1,3           | -                    | -            | 21,5             |
| <hr/>    |            |               |                  |               |                      |              |                  |
| MW ± s   | 34,6 ± 1,5 | 5,7 ± 1,5     | 8,2 ± 2,4        | 1,6 ± 0,3     | -                    | -            | 18,9 ± 6,4       |
| <hr/>    |            |               |                  |               |                      |              |                  |
| AK 1     | 37 (38/37) | 4,6 (5,1/5,3) | 8,7 (8,8/9,3)    | 1,2 (1,2/1,8) | 0,7 (2,5/ - )        | ( - / - )    | 10,2 (8,0/14,7)  |
| AK 2     | 34 (36/35) | 5,3 (5,0/4,6) | 12,2 (16,7/11,5) | 1,3 (1,6/1,2) | -                    | (0,7/ 1,2)   | 14,9 (18,0/19,2) |
| AK 3     | 33 (31/36) | 4,3 (3,5/3,6) | 26,5 (29,7/21,1) | 1,2 (1,4/1,2) | 7,5 (11,2/ 4,4)      | ( - / - )    | 17,1 (17,1/18,3) |
| AK 4     | 35 (35/35) | 6,8 (7,0/6,5) | 7,7 (10,2/ 7,3)  | 1,5 (1,3/1,3) | -                    | ( - / - )    | 16,7 (17,3/14,1) |
| AK 5     | 37 (35/37) | 4,1 (4,2/3,9) | 8,9 (8,0/ 9,7)   | 1,5 (1,6/1,5) | -                    | ( - / 1,7)   | 13,6 (15,5/11,8) |
| AK 6     | 34 (32/37) | 6,2 (5,9/6,2) | 13,6 (15,8/10,2) | 0,8 (1,5/0,8) | 12,5 (14,7/11,6)     | ( - / - )    | 10,0 (7,7/10,7)  |
| AK 7     | 38 (38/38) | 6,2 (6,5/6,7) | 7,3 (6,7/ 8,2)   | 1,7 (1,5/1,8) | 1,3 ( - / 0,1)       | ( - / 0,1)   | 16,8 (18,2/16,1) |
| AK 8     | 32 (33/33) | 4,4 (5,1/3,9) | 24,4 (21,7/22,4) | 1,1 (1,1/1,0) | 28,7 (23,4/21,4)     | ( - / - )    | 13,1 (16,4/12,7) |

Tabelle 6:

Verhältnisse der Adenosinphosphate (ATP/ADP),  
cytosolische und mitochondriale Phosphorylierungspotentiale des ATP (kJ/mol)

| CYTOSOL    |               |                   |                     | MITOCHONDRIMUM   |                     |                                |
|------------|---------------|-------------------|---------------------|------------------|---------------------|--------------------------------|
| Tier Nr.   | ATP/ADP       | ATP/ADP<br>(frei) | $\Delta G$<br>(cyt) | ATP/ADP          | $\Delta G$<br>(mit) | $\Delta \Delta G$<br>(cyt-mit) |
| Ko 1       | 6,8 (6,8/6,6) | 61 (63/64)        | 22,2 (22,2/22,4)    | 4,8 (4,5/ 5,3)   | 18,1 (18,2/17,2)    | 4,1 ( 3,7/ 5,1)                |
| Ko 2       | 5,7 (5,9/5,7) | 52 (50/57)        | 21,7 (21,6/21,9)    | 5,9 (4,6/ 7,0)   | 17,3 (16,8/18,0)    | 4,4 ( 4,8/ 3,9)                |
| Ko 3       | 5,7 (5,8/5,5) | 57 (56/61)        | 22,2 (22,2/22,3)    | 4,6 (4,2/ 5,4)   | 17,1 (16,7/17,7)    | 5,1 ( 5,5/ 4,6)                |
| Ko 4       | 7,3           | 67                | 22,4                | 5,3              | 17,1                | 5,3                            |
| Ko 5       | 7,9           | 72                | 22,5                | 5,0              | 18,4                | 4,1                            |
|            |               |                   |                     |                  |                     |                                |
| MW $\pm$ s | 6,7 $\pm$ 1,0 | 61,8 $\pm$ 7,9    | 22,2 $\pm$ 0,3      | 5,1 $\pm$ 0,5    | 17,6 $\pm$ 0,6      | 4,6 $\pm$ 0,6                  |
|            |               |                   |                     |                  |                     |                                |
| Ak 1       | 5,8 (6,4/5,8) | 51 (51/59)        | 21,8 (21,8/22,3)    | 7,4 ( 7,4/ 5,4)  | 19,0 (18,8/17,8)    | 2,8 ( 3,0/ 4,5)                |
| Ak 2       | 5,2 (4,9/5,4) | 42 (42/45)        | 21,2 (21,2/21,3)    | 9,5 (10,3/ 9,3)  | 19,3 (19,7/19,6)    | 1,9 (1,5/1,7)                  |
| Ak 3       | 4,0 (4,0/4,2) | 55 (54/57)        | 21,6 (21,6/21,5)    | 21,5 (20,8/18,3) | 22,0 (22,4/22,0)    | -0,4 (-0,9/-0,5)               |
| Ak 4       | 8,4 (8,1/8,5) | 72 (72/69)        | 22,5 (22,5/22,5)    | 6,2 ( 8,1/ 5,6)  | 17,6 (18,2/17,4)    | 5,0 (4,3/ 5,0)                 |
| Ak 5       | 6,8 (7,1/6,6) | 72 (75/70)        | 22,4 (22,6/22,3)    | 6,0 ( 5,0/ 6,7)  | 18,8 (18,3/19,2)    | 3,6 (4,3/ 3,1)                 |
| Ak 6       | 4,7 (5,5/4,7) | 64 (57/67)        | 22,1 (21,8/22,1)    | 17,0 (10,4/14,3) | 20,4 (19,3/20,0)    | 1,6 (2,6/ 2,2)                 |
| Ak 7       | 6,9 (6,8/7,0) | 55 (61/54)        | 22,1 (22,4/22,0)    | 4,4 (4,5/ 4,5)   | 16,9 (16,8/16,8)    | 5,2 (5,6/ 5,2)                 |
| Ak 8       | 3,6 (4,1/3,6) | 40 (43/48)        | 21,0 (21,3/21,4)    | 23,1 (20,2/22,3) | 22,1 (21,4/22,3)    | -1,1 (-0,1/-0,9)               |

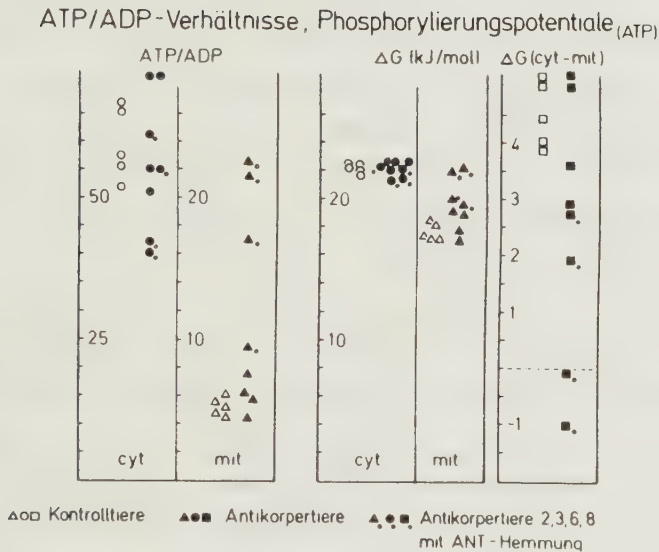
Abb. 5:



Zusammenfassende Darstellung der bestimmten cytosolischen (Kreise) und mitochondrialen (Dreiecke) Metabolitgehalte (ATP, ADP, Phosphat, Kreatinphosphat, Kreatin) in mM.

Die offenen Symbole stehen für die Werte der Kontrolltiere, die geschlossenen Symbole für die immunisierten Tiere Ak 1 - Ak 8. Die Werte der Tiere Ak 2,3,6 und 8, mit deutlicher Hemmung des ANT in vitro, sind durch Punkte hervorgehoben.

Abb. 6:



Zusammenfassende Darstellung der cytosolischen (Kreise) und mitochondrialen (Dreiecke) ATP/ADP-Verhältnisse und der Phosphorylierungspotentiale des ATP, sowie der cytosolisch-mitochondrialen Phosphorylierungspotentialdifferenz (Quadrate). Die offenen Symbole stehen für die Werte der Kontrolltiere, die geschlossenen Symbole für die der immunisierten Tiere Ak 1 - Ak 8. Die Werte der Tiere Ak 2,3,6 und 8, mit deutlicher Hemmung des ANT in vitro, sind durch Punkte hervorgehoben.

Bei der Betrachtung der Substratkonzentrationen fällt auf, daß sich die größten Abweichungen bei den mitochondrialen Konzentrationen finden, besonders bei ATP und Kreatinphosphat. Zu nennen sind hier vor allem das gegenüber einem Normalwert von 8,2 mM stark erhöhte mitochondriale ATP von Ak-Tier 3 (26,5 mM) und von Ak-Tier 8 (24,4 mM). Bemerkenswert ist bei beiden Tieren auch das erniedrigte cytosolische ATP mit 8,8 mM bzw. 7,9 mM (Normalwert 13,2 mM). Die Konzentrationen von ADP zeigen bei Ak-Tier 3 und 8 ein entgegengesetztes Verhalten.

Besonders deutlich zeigt sich der Unterschied bei den ATP/ADP Verhältnissen und den sich daraus unter Einschluß der Phosphatkonzentration errechneten Phosphorylierungspotentialen. Hierbei erweist sich neben der cytosolisch-mitochondrialen Phosphorylierungspotentialdifferenz vor allem das mitochondriale ATP/ADP Verhältnis als besonders empfindlich, da dieser Quotient gleichzeitige Abweichungen von ATP und ADP erfaßt. So ergeben sich zusätzlich zu Tier Ak 3 (21,5) und Ak 8 (23,1) auch für Ak-Tier 2 (9,5) und 6 (17,0) Werte, die deutlich über der Obergrenze des 3s-Bereiches des Kontrollkollektivs von 6,6 ( $MW \pm 3s = 5,1 \pm 1,5$ ) liegen.

Bei der Bestimmung der mitochondrialen Phosphorylierungspotentiale bestätigen sich die bisher beschriebenen Auffälligkeiten der Tiere 3 und 8. Mit Ergebnissen von 22,0 kJ/mol und 22,1 kJ/mol liegen diese Tiere weit über der Grenzmarke ( $MW + 2s = 18,8$  kJ/mol) der Kontrolltiere. Auch die Tiere 2 und 6 überschreiten diesen Wert mit 19,3 bzw. 20,4 kJ/mol, allerdings weit weniger deutlich.

Cytosolisch sind, wie schon erwähnt, die Abweichungen von der

Norm schwächer ausgeprägt. Der Bereich Mittelwert  $\pm 2s$  wird sowohl bei den Substratkonzentrationen, als auch bei den zusammengesetzten Größen (ATP/ADP-Verhältnisse und Phosphorylierungspotentiale) seltener überschritten. Dennoch ist bei Tier 3 und 8 das niedrige ATP (8,8 und 7,9 mM, MW  $13,2 \pm 2,0$  mM) hervorzuheben, wobei zusätzlich bei Tier 8 ein eindeutig erniedrigtes Kreatinphosphat auffällt (13,2 mM, MW  $25,2 \pm 3,6$  mM). Dies führt bei diesem Tier zu einem erniedrigten cytosolischen ATP/ADP-Verhältnis von 40, gegenüber dem Normalwert von 62. Nur Tier Ak 2 besitzt ein ebenso deutlich erniedrigtes ATP/ADP-Verhältnis von 42, zurückzuführen auf eine hohe ADP-Konzentration (3,0 mM gegenüber 2,0 mM Normalwert) und Kreatinkonzentration (29,2 mM gegenüber 18,6 mM) bei diesem Tier. Die Tiere Ak 2 und Ak 8 zeigen auch bei den ermittelten Phosphorylierungspotentialen als Einzige auffallend erniedrigte cytosolische Werte (21,2 bzw. 21,0 kJ/mol, MW  $22,2 \pm 0,3$  kJ/mol).

Die cytosolisch-mitochondriale Phosphorylierungspotential-Differenz ist die Kombination aller bisher dargestellten Größen. Auch sie zeigt die starke Auffälligkeit der Tiere 3 und 8. Diese Tiere sind mit Werten von -0,4 kJ/mol und -1,1 kJ/mol weit entfernt vom Bereich des Kontrollkollektivs  $+4,6 \pm 0,6$  kJ/mol. Ebenfalls deutlich unter der Norm liegen Tier Ak 6 mit +1,6 kJ/mol und Tier Ak 2 mit +1,9 kJ/mol. Auch Ak 1 mit +2,8 kJ/mol ist, wenn auch weniger ausgeprägt, noch unterhalb der MW-2s Grenze von +3,4 kJ/mol.

## 5. Diskussion

### 5.1. Die Problematik der Nicht-wäßrigen Fraktionierung

#### Zu Punkt 3.5.1.: Frierstopp und Lyophilisation

Damit es zu keinen Konzentrationsverschiebungen der untersuchten Substanzen gegenüber den "in vivo" Verhältnissen kommt, müssen die Stoffwechselreaktionen im Gewebe rasch unterbrochen werden, ohne daß dabei die Substanzen selbst zerstört oder verändert werden. Dies wird durch schnelle Abkühlung mittels Flüssigstickstoff erreicht. Ohne Frierstopp kommt es bereits nach Ablauf einer Sekunde zu deutlichen Änderungen der Metabolitspiegel. Durch die Verwendung von Flüssigstickstoff wird das Gewebe in 1 s bis in eine Tiefe von 2,4 mm gefroren (22). Die Anwendung der Frierzange verformt das Meerschweinchenherz in eine ca. 1 mm dicke Scheibe, so daß kein Punkt des Organs mehr als 0,5 mm von der Zangenoberfläche entfernt ist, und die Einfrierzeit somit sicher unter 0,25 s liegt.

Um die gesamte Organwärme in dieser kurzen Zeit abführen zu können, wurde zum einen als Zangenmaterial Aluminium gewählt, welches eine gute Wärmeleitfähigkeit besitzt, zum anderen das Gewicht der Aluminiumblöcke mit je 1 kg etwa 1000-fach höher als das Herzgewicht festgesetzt. Genügend Druck zur schnellen Verformung des Herzens wird durch das Verhältnis "Griff-/Preßseite" der Zange von etwa 5:1 erzeugt. Das vollständige Zuschlagen der Zange erfolgt in weniger als 0,1 s.

Sämtliche Stoffe in den Zellorganellen bzw. im Cytoplasma

schlagen sich durch den Wasserentzug an die Umhüllung des Raumes, in dem sie sich befinden, nieder (13). So haften alle Substanzen des Matrixraumes an der Innenseite der inneren mitochondrialen Membran, die cytosolischen Substrate dagegen an den Außenseiten der Organellen, sowie an der Innenseite der Zellmembran. Es kommt in der Folge zu keiner Lösung oder Umlagerung der untersuchten Metabolite und Enzyme in den verwendeten unpolaren Medien (72).

Definitionsgemäß können alle Substanzen frei innerhalb eines Zellkompartimentes diffundieren, bilden dort also keine Konzentrationsgradienten aus. Folglich lagern sich Enzyme und Metabolite an jeder Stelle der gesamten Membran des jeweiligen Kompartiments in gleicher Menge, also auch im gleichen Verhältnis zueinander ab (13). Diese für jede einzelne Membran charakteristischen Quotienten Membran/Enzym und Membran/Metabolit, also auch Enzym/Metabolit werden zur Berechnung der kompartimentspezifischen Metabolitkonzentrationen herangezogen.

#### Zu Punkt 3.5.2.: Homogenisieren und Filtration

Im Konverterhorn des Sonifiers werden Schallwellen hoher Energie (ca. 150 W) erzeugt und an der Spitze des Horns in das umgebende Medium abgegeben. Die Intensität dieser Schallwellen reicht aus, um sämtliche Zellstrukturen zu zerschlagen. Dadurch werden die innerhalb der Zellorganellen liegenden Substanzen für die späteren Messungen zugänglich.

Wegen seiner Faserstruktur widersteht Bindegewebe der Ultraschalleinwirkung besser als die zellulären Membranen. Zusammen mit allen übrigen zu großen Partikeln wird das Bindegewebe durch

Filtration über Glasperlen vom einwandfrei beschallten Material abgetrennt. Das filtrierte Homogenat besteht aus etwa gleich großen Partikeln, wodurch eine größenunabhängige Wanderung im Dichtegradienten erreicht wird.

Die Analyse des Ausgangsmaterials für die Dichtegradienten-Zentrifugation ergab keine Anreicherung mitochondrialer oder cytoplasmatischer Proteine im Vergleich zu den Werten der normalen unbehandelten Zelle (13). Während der Filtration tritt also keine Selektion bestimmter Membranteile auf.

#### Zu Punkt 3.5.3.: Gleichgewichts-Zentrifugation:

Da die Verwendung von Vertikal- oder Schrägrotoren zu einer Umschichtung des fein abgestuften Gradienten führt, wurden für unsere Versuche Swing-out Rotoren verwendet. Der ausklappbar gelagerte Probenbehälter läßt die Schwerkraft immer in Richtung des Bodens des Gradientenröhrchens wirken und verhindert somit eine Umschichtung des Gradienten.

Getrocknete mitochondriale Membranen sind geringfügig leichter als die übrigen Zellmembranen, wandern im Gradienten also weniger weit und reichern sich in den "oberen" Fraktionen des Gradienten an.

Zu Punkt 3.5.4.: Berechnung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen,  
Problematik der Regressionsrechnung zur Bestimmung der Faktoren a und b:

Bei dem angewandten Verfahren wird eine Gerade errechnet, die in möglichst geringem Abstand an allen Punkten im Koordinatensystem

vorbeiführt. Die optimale Gerade ist diejenige, die so zwischen den Punkten liegt, daß sich die Summe der Abstände der Punkte oberhalb und unterhalb der Geraden gleicht. In diesem Fall wird die Summe der Abstandskquadrate minimal, weshalb dieses Verfahren der linearen Regression auch "Methode der kleinsten Quadrate" genannt wird. Daher ist wichtig, daß erstens der x-Wert (PGK/CS), also die unabhängige Variable, exakt vorgegeben sein muß, und daß zweitens die Streuung der y-Werte ( $M_{\text{tot}}/\text{CS}$ ) für jeden Meßpunkt gleich sein muß, da sonst der Abstand eines weit streuenden Punktes in der Regressionsrechnung geringer zu bewerten wäre als der eines Punktes mit geringerer Breite des statistischen Fehlers.

Da die Enzymmessungen, die die Ergebnisse der PGK- und der CS-Aktivitäten liefern, welche die x-Koordinate eines Meßpunktes bilden, sehr genau sind und immer in Mehrfachbestimmungen ausgeführt werden, kann die erste Bedingung der linearen Regression, die Exaktheit der unabhängigen Variablen, näherungsweise als erfüllt angesehen werden.

Die zweite Bedingung, die Konstanz des statistischen Fehlers, ist jedoch selbst bei 100%ig richtigen Meßwerten der Enzymaktivitäten nicht erfüllt. Die Metabolitbestimmung ist immer mit einem nicht zu vernachlässigenden Fehler behaftet, so daß sich Gleichung (4') schreiben läßt:

$$(4'') \quad (M \pm F)/\text{CS} = a \times \text{PGK}/\text{CS} + b$$

Selbst wenn der Wert des Fehlers F immer gleich ist, ist die durch diesen Fehler bedingte Streuung der Y-Koordinate,  $\pm F/\text{CS}$ , nie

konstant, sondern von einer in jeder Fraktion wechselnden CS-Aktivität abhängig. Fraktionen, also Meßpunkte, mit hoher CS-Aktivität streuen weniger, diejenigen mit niedriger CS-Aktivität stärker um ihren Mittelwert. Die Exaktheit eines Punktes ist also proportional zu dessen CS-Aktivität. Die einzelnen Meßpunkte sind in der Regressionsrechnung also nicht mehr gleichwertig, sondern haben unterschiedliches Gewicht. Dies wird bei der Auswertung berücksichtigt, indem der Computer Meßpunkte, die eine höhere Enzymaktivität besitzen, also "vertrauenswürdiger" sind, öfter zur Regressionsrechnung heranzieht. In der Praxis wird dieses Problem dadurch gelöst, daß ein imaginärer Gradient aus 100 Einzelfraktionen im Computer als Speicherplatz bereitgestellt wird und die acht tatsächlichen Fraktionen so viele der Einzelfraktionen beanspruchen können, wie es ihrer CS-Aktivität entspricht. Wieviele Plätze (F) eine Fraktion i belegt errechnet sich also:

$$P_i = CS_i \times 100 / \text{Summe } CS_{1-8}$$

In diesem künstlichen Gradienten ist der statistische Fehler für jede der 100 Fraktionen konstant, er beträgt  $\pm F \times 100 / \text{Summe } CS_{1-8}$ . Somit ist die zweite Bedingung zur linearen Regression auch erfüllt, wenn dieses eben beschriebene Vorgehen der "gewichteten Regression" angewendet wird.

Da die Menge an gewonnenem Material groß genug war, wurden pro Herz zwei Gradienten beschichtet, also insgesamt  $2 \times 8$  Fraktionen gewonnen. Zum einen aus dem oben erwähnten Grund, zum anderen, um "Ausreißer" bei den Meßpunkten besser zu erkennen, also die

Genauigkeit der errechneten Geraden weiter zu erhöhen, wurden beide Gradienten vor der linearen Regression zusammengefaßt. Anstatt also jeden Einzelgradienten getrennt vollständig auszuwerten und die Konzentrationsangaben dann zu mitteln, erfolgte die Berechnung der Konzentrationen aus nur einer Regressionsrechnung, in die alle 16 Fraktionen, also das Material des gesamten Herzens, einging. Die so bestimmten Endkonzentrationen beider Gradienten können dabei durchaus geringfügig vom Durchschnitt der Konzentrationen der beiden Einzelgradienten abweichen.

Dieses Verfahren ist noch aus einem anderen Grund von Vorteil. Wird das Material nicht gleichmäßig auf beide Gradienten verteilt, so ist der Gradient mit mehr Material genauer zu bestimmen als der mit dem geringeren Anteil. Würden die Ergebnisse aus beiden Gradienten erst zum Schluß gemittelt, käme dieser Unterschied nicht zum Ausdruck. Erst durch das Abgleichen der Fehler aller Fraktionen, die aus einem Herz gewonnen wurden, kann das "wahrscheinlichste" Endresultat bestimmt werden.

Die hier gefundene Verteilung des Proteins in einen cytosolischen Anteil von 62-67 % und einen mitochondrialen Anteil von 38-33 % steht in Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Werten (18). Deren Richtigkeit vorausgesetzt, bedeutet diese Reproduzierbarkeit der bekannten Werte, daß die Nicht-wäßrige Fraktionierung die tatsächliche Verteilung der Metabolite in den Zellkompartimenten wiedergibt. Ein Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen, die ebenfalls mit der Nicht-wäßrigen Fraktionierung (NWF) oder aber mit der Digitoninmethode (DIG) arbeiten, zeigt beispielsweise anhand der gefundenen ATP

Konzentrationen ein hohes Maß an Übereinstimmung. Bei der Digitoninmethode ist allerdings einschränkend zu betonen, daß die Messungen an isolierten Myozyten durchgeführt wurden und nicht am ganzen Organ, was durchaus Ursache für differierende Resultate sein kann. Im Einzelnen werden folgende Angaben für ATP (mM) gemacht:

|            |           |          |          |
|------------|-----------|----------|----------|
| Soboll     | cyt. 8,5  | mit. 5,8 | NWF (77) |
| Kauppinen  | cyt. 8,1  | mit. 6,0 | NWF (25) |
| Geisbuhler | cyt. 11   | mit. 7,5 | DIG (18) |
| Schulze    | cyt. 13,2 | mit. 8,2 | NWF      |

Dennoch bleibt die einzelne Konzentrationsangabe mit einer relativ hohen Ungenauigkeit behaftet. Diese große Schwankungsbreite ist nur teilweise mit individuellen Unterschieden der Herzen der Versuchstiere zu erklären. Die indirekte Gewinnung der Werte aus dem Steigungsfaktor und dem y-Abschnitt einer optimierten Geraden spielt eine beträchtliche Rolle für die Streuung der Ergebnisse der Konzentrationsberechnung. Wie Abb. 4 auf Seite 40 zeigt, genügen bereits geringfügige Schwankungen der Geradensteigung, um große Änderungen in der Höhe des y-Abschnittes zu verursachen.

Es lassen sich aus den Konzentrationsbestimmungen der einzelnen Substanzen dennoch folgende Beobachtungen machen: Im Normalfall ist das mitochondriale ATP etwa 40 % niedriger als das Cytosolische. Der Quotient ATP/ADP ist im Cytosol rund zehnmal größer als im Mitochondrium. Das bestätigt die einleitend betonte Fähigkeit des ANT, Energie aus der oxidativen Phosphorylierung zum Aufbau von gegensinnigen Konzentrationsgradienten für ATP und ADP umwandeln zu

können, also Adeninnukleotide aktiv gegen ein schon bestehendes Konzentrationsgefälle zu transportieren. Die dabei gespeicherte Stoffwechselenergie, ausgedrückt als Differenz der Phosphorylierungspotentiale des ATP, beträgt etwa 4,5 kJ/mol ATP.

## 5.2. Wirkungsweise des ANT

Wie bereits im Abschnitt "Theoretische Grundlagen" ausgeführt, erfolgt die Regulation des Nukleotidtransportes auf elektrophoretischer Basis. Das mit einer negativen Nettoladung am aktiven Zentrum des ANT gebundene ATP wird durch die gegenüber dem Matrixraum stärker positiv geladene cytosolische Seite der inneren mitochondrialen Membran angezogen. Dabei wird entsprechend dem einleitend dargestellten "gated pore" Mechanismus ADP im Gegen Austausch in das mitochondriale Kompartiment aufgenommen. Die Höhe des Ladungsunterschiedes über der Membran bestimmt die Stärke des gerichteten Nukleotidtransportes. Dieser Ladungsunterschied wird durch das cytosolisch-mitochondriale Membranpotential und, in geringerem Umfang, durch einen Protonengradienten erzeugt. Der Energieinhalt dieses elektrochemischen Gradienten, bereitgestellt durch die oxidative Phosphorylierung, wird mittels des ANT zur Erzeugung eines gegenüber dem Mitochondrium erhöhten cytosolischen Phosphorylierungspotential des ATP verwendet. Dieser letzte Schritt im Gesamtsystem der oxidativen Phosphorylierung ist zumindest teilweise "rate limiting" (79). Eine Belastung des Stoffwechsels im Sinne einer zunehmenden cytosolischen Dephosphorylierung des ATP führt zu einer experimentell nachgewiesenen Abnahme der cytosolisch-mitochondrialen Differenz der

Phosphorylierungspotentiale des ATP (77). Die maximale Kapazität des Translokators ist erreicht, wenn alle Moleküle des ANT zu gerichtetem Nukleotidaustausch angeregt sind. Ist ein bestimmter Anteil Carriermoleküle funktionsunfähig, nimmt die Kontrollwirkung des ANT auf die oxidative Phosphorylierung zu, was sich durch eine weiter abnehmende Differenz der Phosphorylierungspotentiale auswirkt.

### 5.3. Beurteilung der Ergebnisse

Es konnten bei einem Großteil der Versuchstiere Antikörper gegen den ANT gefunden werden. Die Antikörpertiter korrelieren jedoch nicht mit einer Hemmung des Nukleotidaustausches in vitro. Das heißt, ein hoher Antikörpertiter muß nicht bedeuten, daß es bei diesem Tier auch zu einer Blockade des Nukleotidtransportes kommt. Dieser fehlende Zusammenhang erklärt sich unter anderem durch das Vorliegen verschiedener Antikörperpopulationen, deren funktionelle Aktivität unterschiedlich ist, und die gegen sich überlappende antigene Determinanten des "Translokationsapparates" gerichtet sind. In Abhängigkeit von ihrer Konzentration und Affinität gegenüber ihren antigenen Determinanten verdrängen diese sich gegenseitig von ihrer Bindungsstelle. Das Vorkommen solcher voneinander differierender Antikörperpopulationen konnte beispielsweise im Serum von Patienten mit primär biliärer Zirrhose beobachtet werden (67). Dabei erwies sich die jeweilige Wirkung auf die Translokatorfunktion als abhängig von der Serumverdünnung.

Die Bestimmung des Austausches von radioaktiv markiertem ADP an isolierten Mitochondrien, als Kriterium für die Carrieraktivität in

vitro, ergab nur bei 4 (Ak 3, 4, 6 und 8) der acht untersuchten Tiere eine Hemmung des Nukleotidaustausches. Es sind also nicht bei allen Tieren, die Antikörper gegen den ANT besitzen, diese Antikörper auch funktionell aktiv.

Bezüglich der intrazellulären Metabolitverteilung verhalten sich vier der "Antikörpertiere", abgesehen von kleineren Abweichungen, wie die Normaltiere. Bei diesen Tieren kann also keine Hemmung des Nukleotidaustausches in vivo angenommen werden. Die übrigen vier immunisierten Tiere (Ak 2, 3, 6 und 8) unterscheiden sich deutlich von den Normaltieren. Sie zeichnen sich vor allem durch ein höheres mitochondriales Phosphorylierungspotential des ATP aus.

Beim Vergleich der Tiere, die den ANT in vitro, und die ihn in vivo beeinflussen, fällt auf, daß ein reduzierter ADP-Austausch in vitro in 3 Fällen auch mit einer ANT-Elockade am lebenden Organ einhergeht (Ak 3, 6 und 8). Aus dieser guten Übereinstimmung läßt sich folgern, daß Antikörper, die an isolierten Mitochondrien funktionell wirksam sind, mit hoher Wahrscheinlichkeit diese Wirkung auch am schlagenden Herzen zeigen.

Es ist wichtig zu betonen, daß im Wesentlichen nur das mitochondriale Phosphorylierungspotential des ATP angestiegen ist, ein parallelverlaufender Abfall des cytosolischen Potentials jedoch nicht in gleichem Maße zu beobachten war. Dies zeigt sich ebenso im ATP/ADP-Verhältnis, welches cytosolisch nur um maximal 30 % abfiel, während Anstiege des mitochondrialen ATP/ADP auf über das Vierfache des Normalwertes gemessen wurden. Dieses stark erhöhte mitochondriale ATP/ADP-Verhältnis wird zum überwiegenden Teil durch einen mitochondrialen "ATP Stau" verursacht. Die gleichzeitige "ADP

Verarmung" war von geringerem Ausmaß.

Es scheint also bei einigen Herzen zu einer Blockade des ATP Ausstroms aus den Mitochondrien ins Cytosol gekommen zu sein. Diese führt zu einem begleitenden Anstieg des mitochondrialen Kreatinphosphat, dessen Konzentration im Normalkollektiv unterhalb der methodischen Nachweisgrenze liegt. Eine gegensinnige Reaktion im Cytosol entzieht sich einer sicheren Beobachtung. Dabei spielt wahrscheinlich der größere Verteilungsraum dieses Kompartiments, die hohen Pufferkapazitäten für ATP und ADP, wodurch ein ADP Überschuß abgefangen werden kann, sowie die, wenn auch begrenzte Kompensation durch Steigerung der Glykolyseaktivität eine Rolle, welche bei Tier AK 8 in einem deutlich erhöhten Laktatanstieg im Koronareffluat sichtbar wird.

Trotz der Veränderungen der Metabolitspiegel kann eine Einwirkung des Energiestoffwechsels auf die Herzarbeit aufgrund des Versuchsansatzes nicht nachgewiesen werden. Da unterschiedliche Herzarbeit Verschiebungen des ATP/ADP-Quotienten bedingt (77), mußte gleiche Herzarbeit vorausgesetzt werden. Unter den hier gewählten physiologischen Anforderungen bei gleicher äußerer Herzarbeit in beiden Kollektiven reicht die Transportkapazität des ANT auch bei den immunisierten Tieren noch für den Energiebedarf im Cytosol aus. In wieweit eine Überforderung des ANT allein durch erhöhte Herzarbeit zu einem die Funktion des Herzens beeinflussenden Energiedefizit führt, werden zukünftige Arbeiten erweisen.

Eine artefizielle Senkung der cytosolisch-mitochondrialen Phosphorylierungspotentialdifferenz von "außen", durch extreme Arbeitsleistung des Herzens, kann anhand der vorliegenden Daten

ausgeschlossen werden. Diese würde, selbst wenn sie möglich wäre, primär zu einer Abnahme des ATP/ADP-Verhältnisses im Cytosol führen, nicht jedoch zu mitochondrialem ATP-Überschuß allein.

Fällt allerdings durch Wirkung von gegen den ANT gerichteten Antikörpern ein zunehmender Teil der Carriermoleküle aus, so wird der verbleibende Restanteil an funktionsfähigem Carrier nach Erreichen seiner jeweiligen maximalen Transportkapazität nicht mehr in der Lage sein, den ATP Bedarf im Cytosol zu decken. Die Folge wäre ein weiteres Absinken des cytosolischen Phosphorylierungspotentiales des ATP bei hohem mitochondrialem Phosphorylierungspotential, da die Atmungskette dann effektiver arbeitet als der ANT. Es ist also zu erwarten, daß die cytosolisch-mitochondriale Phosphorylierungspotentialdifferenz stark abnimmt, und zwar um so eher und stärker, je mehr das Herz belastet wird, je mehr ANT-Moleküle also zu gerichtetem Nukleotidtransport angeregt sind.

Der bei den immunisierten Tieren unverändert gebliebene myokardiale Sauerstoffverbrauch zeigt an, daß die oxidative Phosphorylierung bei diesen Tieren nicht gestört ist. Auch die ATP-Synthese muß bei dem beobachteten deutlichen mitochondrialen ATP Überschuß in ausreichendem Maße ablaufen. Die innere mitochondriale Membran ist somit sicher gut energetisiert und ATP liegt in genügender Menge zum Auswärtstransport ins Cytosol vor. Für eine hohe Stimulierung des ANT sind also alle Voraussetzungen gegeben.

Da es, wie oben bereits erwähnt, normalerweise nicht zu einem merklichen Anstieg des mitochondrialen ATP selbst unter submaximaler Belastung kommt (77), spricht der hier beobachtete Anstieg des mitochondrialen ATP für eine Transporthemmung des ANT. Diese

auffälligen Tiere besitzen einen deutlichen Titeranstieg von Antikörpern gegen den ANT und zeigen eine Hemmung des Nukleotidaustausches in vitro.

Der nur angedeutete Abfall des cytosolischen Phosphorylierungspotential und die den Kontrolltieren entsprechende äußere Herzarbeit weisen jedoch darauf hin, daß es im Cytosol noch zu keinem Energiedefizit größeren Ausmaßes gekommen ist. Die erhöhte Laktatproduktion von Ak 8 zeigt allerdings, daß die anaerobe Energiegewinnung bei diesem Tier offensichtlich zur Kompensation einer zu geringen mitochondrialen Energiebereitstellung aktiviert werden mußte.

#### 5.4. Das pathophysiologische Modell

Eine Funktionseinschränkung des ANT ist prinzipiell durch zwei Modelle zu erklären:

Erstens ist ein direkter Angriff von Antikörpern am ANT selbst denkbar, der zu einer Abnahme oder zu einem Stopp des Nukleotidaustausches führt.

Zweitens könnte aus einer Abnahme der Carrieranzahl pro Flächenanteil mitochondrialer Membran eine erniedrigte Nukleotidtransportkapazität resultieren.

Anhand der Phosphorylierungspotentiale können diese beiden Möglichkeiten nicht differenziert werden und müssen beide in Betracht gezogen werden.

Es stellt sich also die Frage nach der Art der Antikörperwirkung: Unterstellt man eine direkte Bindung der Antikörper am ANT, so ist das Eindringen dieser Antikörper in das Zellinnere vorauszusetzen. Über den Transportvorgang der rezeptorvermittelten Endozytose ist dies prinzipiell möglich (6). Auch wurden bereits Rezeptoren für Immunglobuline an verschiedenen Zelltypen, Makrophagen und anderen lymphoiden Zellen, Lymphozyten, Epithelien und Fibroblasten gefunden (80,57,17). Für viele Proteine, Hormone, Viren und Toxine konnte das Einschleusen in das Zellinnere über rezeptorvermittelte Endozytose beobachtet werden (51). Der sichere Beweis für ein tatsächliches Eindringen von über Endosomen aufgenommenen Antikörpern in das Cytosol konnte allerdings noch nicht geführt werden. Alcaron-Segovia glaubt jedoch intrazellulär antinukleäre Antikörper nachweisen zu können und betont die mögliche pathophysiologische Bedeutung dieses Vorgangs (2).

Da darüber hinaus Kanäle beschrieben werden, die Proteinen den Transport durch die äußere mitochondriale Membran ermöglichen, kann eine Penetration von Antikörpern in die Zelle und deren Angriff direkt am Carrierprotein nicht ausgeschlossen werden (9,83).

Sollte es als Folge einer Antikörperwirkung zu einer Abnahme der Carrierdichte kommen, so kann dies auf zweierlei Arten geschehen:

Es konnte eine antikörpervermittelte Reduktion von Rezeptorproteinen für den Acetylcholinrezeptor (4,10), den Insulinrezeptor (21) und den Mannose-6-Phosphat spezifischen Rezeptor (15) beobachtet werden. Dabei trat in letzterem Fall dieses Protein in Lysosomen auf, wo dieser Rezeptor normalerweise nicht zu finden ist. Es ist also nicht auszuschließen, daß der verstärkte lysosomale Abbau bestimmter Proteine Folge des Auftretens von Antikörpern ist.

Andererseits kann die Menge eines Proteins nicht nur durch verstärkten Abbau, sondern auch durch eine geringere Syntheserate vermindert werden. Eine Hemmung der Neusynthese des ANT auf der Stufe der Translation erscheint möglich. Die Blockade einer t-RNA-Synthetase bei Myositis aufgrund der Wirkung von Autoantikörpern konnte gezeigt werden und unterstützt diese Hypothese (44).

In der letztgenannten Arbeit wird auch aufgezeigt, wie eine intrazelluläre Substanz durch virale Cytolyse dem Immunsystem angeboten und antigenetisch bedeutsam wird. Dieser Mechanismus ist um so wichtiger, da, wie im abschließenden Abschnitt 5.5. aufgeführt, gehäuft Virusinfektionen dem Auftreten von Antikörpern gegen den ANT vorausgehen.

Seitdem bekannt ist, daß mitochondriale Proteine auch an der Zelloberfläche exprimiert sein können (74), muß daneben auch die

Kreuzreaktion von Antikörpern mit Strukturen der Zelloberfläche und des Mitochondriums diskutiert werden. In diesem Fall ist eine Cytolyse zur Induktion der Antikörperproduktion nicht notwendig. Es genügt eine gestörte Immuntoleranz gegen bestimmte Areale der Zelloberfläche, die antigenetisch dem ANT ähneln, um dem ANT als Antigen Bedeutung zu geben.

Einer Aufhebung der Immuntoleranz muß jedoch eine Störung der Immunregulation zugrunde liegen. Diese kann durch Stimulation von B-Lymphozyten erfolgen. Autoantikörper können beispielsweise als Folge einer polyklonalen Stimulation von B-Lymphozyten nach einem Virusinfekt gebildet werden (14) oder möglicherweise durch eine Abschwächung von Faktoren, die beim Gesunden die Stimulation von Lymphozyten hemmen.

#### 5.5. Hinweise für eine klinische Bedeutung der Antikörper

Antikörper gegen den ANT des Herzens im Sinne der organ- und konformationsspezifischen Hemmung des Carriers in vitro konnten in den Seren von Patienten mit primär biliärer Zirrhose (63,64,69), akuter Virusmyokarditis und dilativer Kardiomyopathie (68,70) nachgewiesen werden. Für letztere Erkrankung ergeben sich Hinweise auf eine virusgetriggerte Genese, da bekannt ist, daß sich eine dilatative Kardiomyopathie aus einer akuten viralen Myokarditis entwickeln kann (20,24,26,43). Eine Störung des Immunsystems bei Virusmyokarditis (8) und dilativer Kardiomyopathie (11,16) erscheint möglich.

Die direkte Wirkung auf den ANT läßt sich mit der hier beschriebenen Methode zwar nicht am menschlichen Herzen, wohl aber an

den Organen von Versuchstieren aufdecken. Die nicht-wäßrige Fraktionierung ist in der Lage, eine solche Wirkung anhand einer Änderung des Phosphorylierungspotentials des ATP zu messen, noch bevor es zu einem hämodynamisch sichtbaren Effekt kommt. Diese Änderung ist, wie die dargestellten Ergebnisse zeigen, bereits zu beobachten, bevor es zu einem cytosolischen Energiedefizit kommt, das durch eine Zunahme der anaeroben Glykolyse noch kompensiert werden kann. Daß es bei der dilativen Kardiomyopathie tatsächlich zu einer verstärkten anaeroben Energiegewinnung kommen kann, wird in der Literatur beschrieben (52,58).

Der Nachweis einer Verminderung der Kapazität des ANT durch Antikörper könnte einen Hinweis auf die Pathophysiologie der dilativen Kardiomyopathie geben. Sie würde darüber hinaus einen neuen Mechanismus für Autoimmunerkrankungen aufzeigen, der die Bedeutung intrazellulärer Strukturen als spezifische antigene Determinanten beinhaltet. Diese Bedeutung kann, wie hier gezeigt wurde, darin bestehen, daß Antikörper gegen spezielle intrazelluläre Proteine charakteristische Zellfunktionen beeinträchtigen, was dann zur Manifestation der Erkrankung führt.

## 6. Zusammenfassung

Meerschweinchen wurden mit dem isolierten Adeninnukleotidtranslokator des Herzens immunisiert. Bei einem Teil der Versuchstiere konnten daraufhin Antikörper gegen dieses mitochondriale Protein im Radioimmunoassay gefunden werden. In vitro erwiesen sich diese Antikörper zu einem gewissen Prozentsatz als funktionell aktiv, führten also zu einer Hemmung des Austausches von radioaktiv markiertem ADP an isolierten Mitochondrien.

Da die Aktivität des Carriers am lebenden Organ nicht direkt zu bestimmen ist, wurden die intrazellulären Spiegel der am Transport durch den ANT beteiligten Nukleotide ATP und ADP gemessen und die cytosolischen und mitochondrialen Phosphorylierungspotentiale des ATP bestimmt, die durch die Carrieraktivität in charakteristischer Weise beeinflusst werden. Um das Meerschweinchenherz diesen Messungen zugänglich zu machen, wurde es zuvor isoliert schlagend perfundiert und durch Noradrenalin-gabe definierten Belastungen ausgesetzt. Nach Erreichen des "steady states" des Stoffwechsels, kenntlich anhand der Konstanz der hämodynamischen Parameter, blieb die Herzarbeit aller immunisierten Tiere unverändert gegenüber den nicht immunisierten Kontrollherzen. Auch der myokardiale Sauerstoffverbrauch, die Aktivität der oxidativen Phosphorylierung anzeigend, war unbeeinflusst. Die anaerobe Glykolyse allerdings, bestimmt anhand der Laktatkonzentration im Koronareffluat, war bei einem Tier deutlich stimuliert.

Mit Hilfe der Nicht-wäßrigen Fraktionierung konnten bei den Tieren, die bereits in vitro durch eine ANT Hemmung aufgefallen waren,

deutliche Veränderungen der intrazellulären Nukleotidkonzentrationen gemessen werden. So ist es, vor allem durch eine stark erhöhte ATP Konzentration in den Mitochondrien, zu einem Anstieg des mitochondrialen Phosphorylierungspotentials des ATP gekommen. Die cytosolisch-mitochondriale Potentialdifferenz, die durch den ins Cytosol gerichteten ATP Nettotransport aufgebaut wird, war deutlich reduziert.

Dieses Ergebnis spricht für eine antikörperinduzierte Blockade des ATP-ADP Transportes durch die innere mitochondriale Membran. ATP Synthese und oxidative Phosphorylierung sind - bei hohem mitochondrialem ATP und unverändertem myokardialen Sauerstoffverbrauch - anscheinend nicht beeinträchtigt. Es steht also genug Energie zum Aufbau eines den gerichteten Nukleotidtransport stimulierenden Membranpotentials zur Verfügung.

Allerdings führte diese Blockade des Carriers unter den hier gewählten Bedingungen noch nicht zu einem Energiedefizit im Cytosol, was durch das nahezu unverändert gebliebene cytosolische Phosphorylierungspotential belegt, und durch die gute Herzarbeit auch der Tiere bestätigt wird, die eine Hemmung des Nukleotidtransportes zeigten. Zumindest in einem Fall reichte jedoch das über den ANT ins Cytosol transportierte ATP nicht aus, um dort den Energiebedarf zu decken, so daß zusätzlich die anaerobe Glykolyse zur Kompensation eines sonst aufgetretenen manifesten ATP Mangels im Cytosol stimuliert werden musste.

Durch den Vorgang der rezeptorvermittelten Endozytose erscheint eine Aufnahme der gegen den ANT gerichteten Antikörper über Fc-Rezeptoren der Zelloberfläche ins Zellinnere möglich. Da Antikörper

gegen den ANT bei verschiedenen Herzerkrankungen auftreten, so zum Beispiel bei der Virusmyokarditis und der dilativen Kardiomyopathie, kommt der Bindung von Antikörpern an spezifische antigene Determinanten des Zellinneren, hier also an den ANT der inneren mitochondrialen Membran, möglicherweise eine klinische Bedeutung zu. Die vorliegende Arbeit deutet darauf hin, daß einer antikörpervermittelten Hemmung des Energiestoffwechsels durch Blockade des ANT eine pathophysiologische Bedeutung bei den genannten Erkrankungen zukommen könnte.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1) Akerboom, T.P.M., Bookelman, H., Tager, J.M., 1977, Control of ATP transport across the mitochondrial membrane in isolated rat-liver cells, FEBS Letters 74:50-54.
- 2) Alcaron-Segovia, D., 1981, Penetration of antinuclear antibodies into immunoregulatory T-cells: pathogenetic role in the connective tissue disease, Clinics in Immunology and Allergy 1:117-126.
- 3) Altschuld, R.A., Brierley, G.P., 1977, Interaction between the creatine kinase of rat heart mitochondria and oxidative phosphorylation, J. Mol. Cell. Cardiol. 9:875-896.
- 4) Appel, S.H., Anwyl, R., McAdams, M.W., Elias, S., 1977, Accelerated degradation of acetylcholine receptor from cultured rat myotubes with myasthenia gravis sera and globulins, Proc. Natl. Acad. Sci. 74:2130-2134.
- 5) Bergmeyer, H.U., 1970, Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim.
- 6) Besterman, J.M., Low, R.B., 1983, Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membrane dynamics, Biochem. J. 210:1-13.
- 7) Bünger, R., Sommer, O., Walter, G., Stiegler, H., Gerlach, E., 1979, Functional and metabolic features of an isolated perfused guinea pig heart performing pressure-volume work, Pflügers Arch. 380:259-266.
- 8) Cambridge, G., McArthur, C.G.C., Waterson, A.P., Goodwin, J.F., Oakley, C.M., 1979, Antibodies to coxsackie B virus in congestive cardiomyopathy, Br. Heart J. 41:692-696.
- 9) Colombini, M., 1979, A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane, Nature 279:643-645.
- 10) Drachman, D.B., Adams, R.N., Josifek, L.F., Self, S.G., 1982, Functional activities of autoantibodies to acetylcholine receptors and the clinical severity of myasthenia gravis, N. Engl. J. Med. 307:769-775.
- 11) Eckstein, R., Mempel, W., Bolte, H.-D., 1982, Reduced suppressor cell activity in congestive cardiomyopathy and myocarditis, Circulation 65:1224-1229.

- 12) Eckstein, R., Mempel, W., Heim, M., Bolte, H.-D., 1984, The role of human leucocyte antigen genes and low suppressor cell activity in the pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy, in: Viral Heart Disease, Ed.: Bolte, H.-D., Springer, 151-161.
- 13) Elbers, R., Heldt, H.W., Schmucker, P., Soboll, S., Wiese, H., 1974, Measurement of the ATP/ADP ratio in mitochondria and in the extramitochondrial compartment by fractionation of the freeze-stopped liver tissue in non-aqueous media, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355:378-393.
- 14) Fauci, A.S., 1983, Activation and regulation of human immune responses: Implications in normal and disease states, Ann. Int. Med. 99:61-75.
- 15) Figura, K. von, Gieselmann, V., Hasilik, A., 1984, Antibody to mannose 6-phosphat specific receptor induces receptor deficiency in human fibroblasts, The EMBO J. 3:1281-1286.
- 16) Fowles, R.E., Bieber, C.P., Stinson, E.B., 1979, Defective in vitro cell function in idiopathic congestive cardiomyopathy, Circulation 59:483-491.
- 17) Frey, J., Einsfelder, B., 1984, Induction of surface IgG receptors in cytomegalovirus-infected human fibroblasts, Eur. J. Biochem. 138:213-216.
- 18) Geisbuhler, T., Altschuld, R.A., Trewyn, R.W., Ansel, A.Z., Lamka, K., Brierley, G.P., 1984, Adenine nucleotide metabolism and compartmentalisation in isolated adult rat heart cells, Circ. Res. 54:536-546.
- 19) Goding, J.W., 1978, Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent, J. Immun. Meth. 20:241-253.
- 20) Grist, N.R., Bell, E.J., 1969, Coxsackie virus and the heart, Editorial Am. Heart J. 77:295-300.
- 21) Grunfeld, C., 1984, Antibody against the insulin receptor causes disappearance in 3T3-L1 cells: a possible explanation of antibody induced insulin resistance, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:2508-2511.
- 22) Grunst, J., 1968, Dissertation med. Fakultät, Univ. München.
- 23) Heldt, H.W., Pfaff, E., 1969, Adenine nucleotide translocation in mitochondria, Eur. J. Biochem. 10:494-500.
- 24) James, T.N., 1983, Myocarditis and cardiomyopathy, N. Engl. J. Med. 308:39-41.

- 25) Kauppinen, R.A., Hiltunen, J.K., Hassinen I.E., 1980, Subcellular distribution of phosphagens in isolated perfused rat heart, FEEC Letters 112:273-276.
- 26) Kawai, C., Matsumori, A., Kitaura, Y., Takatsu, T., 1980, Viruses and the heart: viral myocarditis and cardiomyopathy, Prog. Cardiol. 7:141-162.
- 27) Klingenberg, M., 1972, ATP Synthesis and adenine nucleotide transport in mitochondria, in: Mitochondria/Biomembranes Proceedings of the 8th FEBS Meeting in Amsterdam, Elsevier, Amsterdam, 147-162.
- 28) Klingenberg, M., 1980, The ADP-ATP translocation in mitochondria, a membrane potential controlled transport, J. Membrane Biol. 56:97-105.
- 29) Klingenberg, M., 1981, Membrane protein oligomeric structure and transport function, Nature 290:449-453.
- 30) Klingenberg, M., 1985, The ADP/ATP carrier in mitochondrial membranes, in: The Enzymes of Biological Membranes , Ed. A.N. Martonosi, 2nd Ed., 1-61.
- 31) Klingenberg, M., Pfaff, E., 1965, Structural and functional compartmentation in mitochondria, in: Proceedings of the Symposium on Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria , Edt. Tager, J., M. et al., Elsevier, Amsterdam, 180-201.
- 32) Klingenberg, M., Rottenberg, H., 1977, Relation between the gradient of the ATP/ADP ratio and the membrane potential across the mitochondrial membrane, Eur. J. Biochem. 73:125-130.
- 33) Klingenberg, M., Riccio, P., Aquila, H., 1978, Isolation of the ADP,ATP carrier as the carboxyatractylate-protein complex from mitochondria, Biochim. Biophys. Acta 503:193-210.
- 34) Klingenberg, M., Aquila, H., Riccio, P., 1979, Isolation of functional membrane proteins related to or identical with the ADP,ATP carrier of mitochondria, Meth. Enzym. 56:407-414.
- 35) Klingenberg, M., Hackenberg, H., Krämer, R., Lin, C.S., Aquila, H., 1980, Two transport proteins from mitochondria: I. Mechanistic aspects of the ADP,ATP translocator, Ann. N.Y. Acad. Sci. 358:83-95.

- 36) Klingenberg, M., Grebe, K., Appel, M., 1982, Temperature dependence of ADP/ATP translocation in mitochondria, Eur. J. Biochem. 126:263-269.
- 37) Kobayashi, K., Neely, J.R., 1979, Control of maximum rates of glycolysis in rat cardiac muscle, Circ. Res. 44:166-175.
- 38) Krämer, R., Klingenberg, M., 1980, Modulation of the reconstituted adenine nucleotide exchange by membrane potential, Biochemistry 19:556-560.
- 39) Krämer, R., Klingenberg, M., 1980, Electrophoretic control of reconstituted nucleotide translocation, Biochemistry 21:1082-1089.
- 40) Langone, J.J., 1978, Protein A: A tracer for general use in immunoassay, J. Immun. Meth. 24:269-285.
- 41) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193:265-275.
- 42) Lowry, O.H., Passoneau, J.V., 1972, in: A flexible system of enzymatic analysis, Ed. Lowry, O.H., Passoneau, J.V., Academic Press, N.Y., London, 86-89.
- 43) Lowry, P.J., Edwards, C.W., Nagle, R.E., 1982, Herpes like virus particles in myocardium of patient progressing to congestive cardiomyopathy, Br. Heart J. 48:501-503.
- 44) Mathews, M.B., Bernstein, R.M., 1983, Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity, Nature 304:177-179.
- 45) Mitchell, P., 1961, Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism, Nature 191:144-148.
- 46) Mitchell, P., Moyle, J., 1969, Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria, Eur. J. Biochem. 7:471-484.
- 47) Neely, J.R., Leiberman, H., Battersby, E.J., Morgan, H.E., 1967, Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart, Am. J. Physiol. 212:804-814.

- 48) Nicholls, D.G., 1974, The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat liver mitochondria as determined by ion distribution, Eur. J. Biochem. 50:305-315.
- 49) Padan, F., Rottenberg, H., 1973, Respiratory control and the proton electrochemical gradient in mitochondria, Eur. J. Biochem. 40:431-437.
- 50) Palmieri, F., Klingenberg, M., 1979, Direct methods for measuring metabolite transport and distribution in mitochondria, Methods Enzymol. 56:279-301.
- 51) Pastan, I., Willingham, M.C., 1983, Receptor-mediated endocytosis: coated pits, receptosomes and the Golgi, TIBS 8:250-255.
- 52) Peters, T.J., Wells, G., Oakley, C.M., Brooksby, I.A.B., Jenkins, B.S., Webb-Peploe, M.M., Coltart, D.J., 1977, Enzyme analysis of endomyocardial biopsy specimens from patients with cardiomyopathies, Br. Heart J. 39, 1333-1339.
- 53) Pfaff, E., Klingenberg, M., 1968, Adenine nucleotide translocation of mitochondria. I. Specificity and control in, Eur. J. Biochem. 6:66-79.
- 54) Riccio, P., Aquila, H., Klingenberg, M., 1975, Solubilization of the carboxyatractylate binding protein from mitochondria, FEBS Letters 56:129-132.
- 55) Riccio, P., Aquila, H., Klingenberg, M., 1975, Purification of the carboxyatractylate binding protein from mitochondria, FEBS Letters 56:133-138.
- 56) Riegler, K.M., Clancy, R.L., 1975, Effect of norepinephrine on myocardial intracellular hydrogen ion concentration, Am. J. Physiol. 229:344-349.
- 57) Rodewald, R., 1980, Distribution of immunoglobulin G receptors in the small intestine of the young rat, J. Cell. Biol 85:18-32.
- 58) Schultheis, H.-P., Bolte H.-D., Fischer, S., Cyran, J., 1980, Enzymatic analysis and collagen content in endomyocardial biopsy samples of patients with congestive cardiomyopathy of unknown etiology, Clin. Cardiol. 3:329-334.
- 59) Schultheis, H.-P., Klingenberg, M., 1982, Organ- and conformation-specificity of the adenine nucleotide translocator, Second Eur. Bioenerg. Conf., short reports, pp.471-473.

- 60) Schultheiß, H.-P., Klingenberg, M., 1985, Immuno-electrophoretic characterization of the ADP/ATP carrier from heart, kidney and liver, Arch. Biochem. Biophys. 239:279.
- 61) Schultheiß, H.-P., Klingenberg, M., 1984, Immunochemical characterization of the adenine nucleotide translocator: organ- and conformation specificity, Eur. J. Biochem 143:599-605.
- 62) Schultheiß, H.-P., Berg, P., Klingenberg, M., 1983, The mitochondrial adenine nucleotide translocator is an antigen in primary biliary cirrhosis, Clin. exp. immunol. 54:648-654.
- 63) Schultheiß, H.-P., Berg, P.A., Klingenberg, M., 1984, Inhibition of the adenine nucleotide translocator by organ specific autoantibodies in primary biliary cirrhosis, Clin. exp. Immunol. 58:596-602.
- 64) Schultheiß, H.-P., Bolte, H.-D., Schwimmbeck, P., Klingenberg, M., 1983, The antigenic characteristics and the significance of the adenine nucleotide translocator (ANT) as a major autoantigen to anti-mitochondrial antibodies in myocarditis (MC) and congestive cardiomyopathy (CCM), J. mol. cell. cardiol. 15:85.
- 65) Schultheiß, H.-P., Schwimmbeck, P., Berg, P.A., 1984, The biochemical characterisation of auto-antibodies against the adenine-nucleotide-translocator in primary biliary cirrhosis (PBC), Third Eur. Bioenerg. Conf., short reports, 3B:451-452.
- 66) Schultheiß, H.-P., Schwimmbeck, P., Bolte, H.-D., 1984, Organ specificity of the inhibitor- and substrate binding site of the adenine nucleotide translocator (ANT), J. Mol. Cell. Cardiol. 16, supp. II:69
- 67) Schultheiß, H.-P., Schwimmbeck, P., Berg, P.A., 1984, Charakterisierung verschiedener, funktionell aktiver Autoantikörper gegen den Adeninnukleotidtranslokator bei Patienten mit primär biliärer Zirrhose, Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 90:1511-1514.
- 68) Schultheiß, H.-P., Schwimmbeck, P., Bolte, H.-D., Klingenberg, M., 1985, The antigenic characteristics and the significance of the adenine nucleotide translocator as a major autoantigen to anti-mitochondrial antibodies in dilated cardiomyopathy, Adv. Myocardiol. 6:311-327.
- 69) Schultheiß, H.-P., 1985, Achievements and perspectives in mitochondrial research, Edts. Palmieri, F., Saccone, C., in press

- 70) Schwimbeck, P., 1984, Charakterisierung von Autoantikörpern gegen den Adeninnukleotidtranslokator bei Myokarditis und Dilativer Kardiomyopathie, Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität München.
- 71) Seraydarian, K., Mommaerts, W.F.H.M., Wallner, A., 1962, The amount and compartmentation of adenosine diphosphate in muscle, Biochim. Biophys. Acta 65:443-460.
- 72) Siebert, G., 1961, Enzyme und Substrate der Glykolyse in isolierten Zellkernen, Biochem. Z. 334:369-387.
- 73) Smith, A.D., 1967, Preparation, properties and conditions for assay of mitochondria: slaughterhouse material, small scale, Methods in Enzymology, Academic Press, New York, San Francisco, London, 81-86.
- 74) Smith, R., Huston, M.M., Jenkins, R.N., Huston, D.P., Rich, R.R., 1983, Mitochondria control expression of a murine cell surface antigen, Nature 306:599-601.
- 75) Soboll, S., Scholz, R., Heldt, H.W., 1978, subcellular metabolite concentrations. Dependence of mitochondrial and cytosolic ATP systems on the metabolic state of perfused rat liver. Eur. J. Biochem. 87:377-390.
- 76) Soboll, S., Scholz, R., Freisl, M., Elbers, R., Heldt, H.W., 1980, in: Use of isolated liver cells and kidney tubules in metabolic studies, Ed. Tager, J.M., Söling, H.D., Williamsson, J.R., North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- 77) Soboll, S., Bünger, R., 1981, Compartmentation of adenine nucleotides in the working guinea pig heart stimulated by noradrenaline, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362:125-132.
- 78) Steenbergen, Ch., Deleeuw, G., Williamsson, J.R., 1978, Analysis of control of glycolysis in ischemic hearts having heterogenous zones of anoxia, J. Mol. Cell. Cardiol. 10:617-639.
- 79) Tager J.M., Wanders, R.J.A., Groen, A.K., Kunz, W., Bohnensack, R., Küster, U., Letko, G., Eöhme, G., Duszynski, J., Wojtczak, L., 1983, Control of mitochondrial respiration, FEBS Letters 151:1-9.
- 80) Unkeless, J.C., Fleit, H., Mellman, I.S., 1981, structural aspects and heterogeneity of immunoglobulin Fc receptors, Adv. Immunol. 31:247-270.
- 81) Williamson, J.R., 1979, Mitochondrial function in the heart, Ann. Rev. Physiol. 41:485-506.

- 82) Wollenberger, A., Ristau, O., Schoffa, G., 1960, Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebstücke, Pflüger's Arch. 270:399-412.
- 83) Zalman, L.S., Nikaido, H., Kagawa, Y., 1980, Mitochondrial outer membrane contains a protein producing nonspecific diffusion channels, J. Biol. Chem. 255:1771-1774.
- 84) Zollinger, W.D., Dalrymple, J.M., Artenstein M.S., 1976, Analysis of parameters affecting the solid phase radioimmunoassay quantitation of antibody to meningococcal antigens, J. Immunol. 117:1788-1898.
- 85) Zuurendonk, P.F., Tager, J.M., 1974, Rapid separation of particulate components and soluble cytoplasm of isolated rat-liver cells, Biochim. Biophys. Acta 333:393-399.

### Danksagung

Folgende Personen waren mitbeteiligt am Zustandekommen dieser Arbeit:

An der medizinischen Klinik I der Universität München:

Herr Dr. med. H.P. SCHULTHEISS, Laborleiter, stellte die Mittel zum Erwerb der nötigen Geräte und zur Durchführung der Versuche zur Verfügung, war aber vor allem durch seine stets fördernden Ideen und Anregungen maßgeblich an der gesamten Durchführung der Arbeit beteiligt.

Frau V. HOLTZMANN, mediz. techn. Assistentin, war behilflich bei der Durchführung von Titerbestimmungen und Nukleotidaustauschversuchen in vitro.

Am Institut für physiologische Chemie der Universität Düsseldorf:

Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. S. SOPOLL hatte sowohl durch ihre praktischen Anleitungen, wie auch durch theoretische Hinweise einen entscheidenden Anteil an der erfolgreichen Einführung der Methode der Nicht-wäßrigen Fraktionierung.

Am Institut für physiologische Chemie der Universität München:

Herr Privatdozent Dr. B. F. BECKER stellte die "Working Heart" Apparatur zur Verfügung. Er war wesentlich bei der Präparation der isolierten Meerschweinchenherzen und an der Messung der hämodynamischen Daten behilflich.

Den genannten Damen und Herren gebührt besonderer Dank für ihre Mitwirkung an dieser Promotion.

Lebenslauf:

5. 8. 1956: geboren in München,  
Eltern: Gerhard Schulze, Ingenieur  
Edith Schulze, geb. Ebeling, Lehrerin
- 1963: Eintritt in die Grundschule
- 1967: Eintritt in das Thomas-Mann Gymnasium, München
25. 6. 1976: Abitur in München
- Juli 1976 -
- Okt. 1977: Zivildienst
- Nov. 1977: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig  
Maximilians-Universität in München.
- 1980: Beginn der Promotionsarbeiten in der 1. mediz. Klinik im  
Klinikum Großhadern der Universität München,  
Direktor Prof. Dr. G. Riecker.
- 1982: Heirat mit Marion Schulze, geb. Kögler
18. 5. 1984: ärztliche Prüfung in München
4. 7. 1984: Approbation als Arzt
- ab Okt. 1984: wissenschaftlicher Assistent der 1. mediz. Klinik  
im Klinikum Großhadern der Universität München.





